

Opinnäytetyö (AMK)

Bio- ja elintarviketekniikka

Biitekniikka

2011

Jenna Jacobino

# *IN VITRO* -MÄÄRITYKSEN KEHITTÄMINEN $\beta$ -AMYLOIDIEN AGGREGAATION HAVAITSEMISEEN



TURUN AMMATTIKORKEAKOULU  
TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Jenna Jacobino

## *IN VITRO* -MÄÄRITYKSEN KEHITTÄMINEN $\beta$ -AMYLOIDIEN AGGREGAATION HAVAITSEMISEEN

Opinnäytetyön tarkoituksena oli kehittää uusi menetelmä  $\beta$ -amyloidien aggregaation havaitsemiseen. Opinnäytetyö suoritettiin Turun yliopiston biolääketieteen laitoksella osana projektia, jossa kehitettiin nanopartikkeliperusteista, epäspesifistä menetelmää Alzheimerin taudin tutkimukseen.

Menetelmä perustui aikaerotteisen fluoresenssin resonanssienergian siirron havaitsemiseen. Määrittämisessä akseptorina toimivat Alexa Fluor 680 -värillä leimatut gammaglobuliinit kilpailivat  $\beta$ -amyloidien tai  $\beta$ -amyloidiaggregaattien kanssa adsorboitumisesta donorina toimivien Eu(III)-nanopartikkelien pinnalle. Energiansiirtosignaalin suuruus muuttui suhteessa adsorboituneen leimaproteiinin määrään.

Työssä pyrittiin optimoimaan mittausolosuhteita sekä tutkimaan, miten eri olosuhteet vaikuttivat  $\beta$ -amyloidien aggregoitumiseen ja miten se näkyi mitattavassa signaalissa. Lisäksi testattiin inkubointiajan vaikutusta  $\beta$ -amyloidien aggregoitumiseen. Käytettyjä laimennusliuoksia olivat dimetyylisulfoksidi, Ham's F-12 -medium, fosfaattipuskuroitu suolaliuos, 10 mM suolahappo, suolaliuos (10 mM HCl, 150 mM NaCl) ja vesi. Työssä tutkittiin myös kurkumiini-lääkeaineen vaikutusta aggregaattien muodostumisessa. Lopuksi menetelmän toimivuutta tutkittiin absorbanssimittausten ja Western blot -analyysin avulla.

Menetelmän dynaamiseksi mittausalueeksi arvioitiin 25-700  $\mu\text{g/l}$  aggregoitumattomalle  $\beta$ -amyloidipeptidille. Mitattaessa vedessä ja dimetyylisulfoksidissa inkuboituja  $\beta$ -amyloidinäytteitä inkubaatioajan funktiona, energiansiirtosignaali ei kasvanut tai kasvoi hitaasti, mikä tarkoittaisi  $\beta$ -amyloidien säilymistä monomeereina ainakin lyhyitä aikoja. Muissa olosuhteissa  $\beta$ -amyloidit aggregoituvat voimakkaammin. Partikkeliperusteisen menetelmän tulosten mukaan kurkumiinilla ei voitu osoittaa olevan vaikutusta  $\beta$ -amyloidiaggregaattien muodostumiseen.

### ASIASANAT:

(Aikaerotteinen fluorometria, Alzheimerin tauti,  $\beta$ -amyloidi, fluoresenssin resonanssienergian siirto, nanopartikkeli)

Jenna Jacobino

## DEVELOPMENT OF *IN VITRO* ASSAY FOR DETECTION OF $\beta$ -AMYLOID AGGREGATION

The purpose of the thesis project was to develop a method for the detection of  $\beta$ -amyloid aggregation. The work was performed in the Institute of Biomedicine at the University of Turku. It was part of a project in which a nonspecific method based on nanoparticles was developed for the study of Alzheimer's disease.

The method was based on the detection of fluorescence resonance energy transfer by time-resolved fluorometry. In the assay, Alexa Fluor 680 dye-labeled gamma globulins competed with  $\beta$ -amyloids or  $\beta$ -amyloid aggregates for adsorption on to the surface of the Eu(III) nanoparticles. The detected signal varied in proportion to the amount of adsorbed labeled protein on the surface.

In this thesis project optimal measurement conditions were striven for while studying how the different conditions affected the  $\beta$ -amyloid aggregation and how, the effect was reflected in the measured signal. In addition, the effect of incubation time on the aggregation of  $\beta$ -amyloid was investigated. Dimethyl sulfoxide, Ham's F-12 medium, phosphate buffered saline, 10 mM hydrochloric acid, a salt solution (10 mM HCl, 150 mM NaCl) and water were used as diluents. Furthermore, the effect of a drug, curcumin, was also studied. Finally, absorbance measurements and Western blotting analysis were performed to verify the performance of the method.

The dynamic range of the method was estimated to be 25-700  $\mu\text{g/l}$  for unaggregated  $\beta$ -amyloid. When the  $\beta$ -amyloid samples incubated in water and dimethyl sulfoxide were measured as a function of the incubation time, the energy transfer signal did not increase, or it increased slowly. This suggested that the  $\beta$ -amyloid remained in a monomeric form at least for short periods. In other conditions,  $\beta$ -amyloid aggregated faster. According to the results obtained by the particle-based method, curcumin could not be shown to affect the formation of  $\beta$ -amyloid aggregates.

### KEYWORDS:

(Alzheimer's disease,  $\beta$ -amyloid, fluorescence resonance energy transfer, nanoparticle, time-resolved fluorometry)

# SISÄLTÖ

## KÄYTETYT LYHENTEET

<b>1 JOHDANTO</b>	<b>8</b>
<b>2 PROTEIINIT JA PEPTIDIT</b>	<b>9</b>
2.1 Proteiinien rakenne	9
2.2 $\beta$ -amyloidit	10
2.3 $\beta$ -amyloidien aggregoituminen	10
<b>3 PROTEIINIEN ADSORPTIO</b>	<b>13</b>
3.1 Ulkoisten tekijöiden vaikutus proteiinien adsorptioon	13
3.2 Proteiinien ominaisuuksien vaikutus adsorptioon	14
3.3 Pinnan ominaisuuksien vaikutus proteiinien adsorptioon	15
<b>4 FLUOROMETRIA</b>	<b>17</b>
4.1 Aikaerotteinen fluorometria	18
4.2 Fluoresenssin resonanssienergian siirto	19
<b>5 <math>\beta</math>-AMYLOIDIAGGREGAATTIEN TUTKIMISEEN KÄYTETTYJÄ <i>IN VITRO</i> - MENETELMIÄ</b>	<b>20</b>
5.1 Tioflaviini T -detektiomenetelmä	20
5.2 Kongonpuna-detektiomenetelmä	21
5.3 Transmissioelektronimikroskopia	21
5.4 Fourier-infrapunaspektroskopia	22
5.5 Western blot -analyysi	22
<b>6 MATERIAALIT JA LAITTEET</b>	<b>23</b>
6.1 Kurkumiini	23
6.2 Alexa Fluor 680 -värillä leimattu gammaglobuliini	23
6.3 Nanopartikkelit	24
6.4 Victor <sup>2</sup> -monileimamittalaite	24
6.5 NanoDrop 1000 -spektrofotometri	24
<b>7 MENETELMÄT</b>	<b>25</b>
7.1 Määrittelyn suoritus	26
7.2 Alexa Fluor 680 -värillä leimatun gammaglobuliinin pitoisuuden optimointi	26
7.3 Eri olosuhteiden vaikutus leimatun gammaglobuliinin adsorptioon	26
7.3.1 Dimetyylisulfoksidi	27
7.3.2 Ham's F -12 medium	27
7.3.3 Suolapitoisuus	27

7.4 $\beta$ -amyloidinäyteputkien valmistus	27
7.5 Inkubointiajan vaikutus $\beta$ -amyloidien aggregoitumiseen	28
7.6 $\beta$ -amyloidipitoisuuden vaikutus aggregaatioon ja menetelmän toimintaan	28
7.6.1 $\beta$ -amyloidin pitoisuuden vaikutus aggregaatioon – pitoisuus inkubaatiossa	28
7.6.2 $\beta$ -amyloidin kalibraatiokäyrä – pitoisuus kaivossa	29
7.7 Olosuhteiden vaikutus $\beta$ -amyloidien adsorptioon	29
7.8 Olosuhteiden vaikutus $\beta$ -amyloidien aggregoitumiseen	30
7.8.1 Dimetyylisulfoksidi	30
7.8.2 Ham's F-12 -medium	31
7.8.3 Fosfaattipuskuroitu suolaliuos, vesi, suolaliuos (10 mM HCl, 150 mM NaCl) ja suolahappo (10 mM HCl)	31
7.8.4 Kurkumiini	32
7.9 $\beta$ -amyloidien tutkiminen spektrofotometrillä	33
7.10 Western blot -analyysi	33
<b>8 TULOKSET JA ARVIOINTI</b>	<b>35</b>
8.1 Leimatun gammaglobuliinin pitoisuuden optimointi	35
8.2 Olosuhteiden vaikutus leimatun gammaglobuliinin adsorptioon	36
8.2.1 Dimetyylisulfoksidi	37
8.2.2 Ham's F-12 -medium	37
8.2.3 Suolakonsentraatio	38
8.3 $\beta$ -amyloidipitoisuuden optimointi	39
8.4 Olosuhteiden vaikutus $\beta$ -amyloidien adsorptioon	40
8.5 Olosuhteiden ja inkuboinnin vaikutus $\beta$ -amyloidien aggregoitumiseen	41
8.5.1 Laimennusliuoksena dimetyylisulfoksidi	43
8.5.2 Laimennusliuoksena Ham's F-12 -medium	45
8.5.3 Laimennusliuoksena fosfaattipuskuroitu suolaliuos	46
8.5.4 Laimennusliuoksena suolaliuos (10 mM HCl, 150 mM NaCl)	47
8.5.5 Laimennusliuoksena suolahappo (10 mM)	48
8.5.6 Laimennusliuoksena vesi	49
8.6 Kurkumiinin vaikutus	50
8.7 Absorbanssimittaukset	52
8.8 Western blot -analyysi	53
<b>9 YHTEENVETO</b>	<b>55</b>
<b>LÄHTEET</b>	<b>57</b>

## KUVAT

Kuva 1. Western blot -analyysin tulokset.

54

## KUVIOT

Kuvio 1. A $\beta$ :n aggregoitumisen vaiheet	11
Kuvio 2. Proteiinien sitoutumiskonfiguraatio eri konsentraatioissa.	15
Kuvio 3. Stokesin siirtymä.	17
Kuvio 4. Aikaerotteisen fluorometrian periaate.	18
Kuvio 5. Fluoresenssin resonanssienergian siirron periaate.	19
Kuvio 6. Kurkumiinin rakenne	23
Kuvio 7. Kilpaileva määrittäminen.	25
Kuvio 8. Normalisoitu FRET-signaali leimatun gammaglobuliinin pitoisuuden funktiona.	36
Kuvio 9. Normalisoitu FRET-signaali DMSO:n tilavuusosuuden funktiona.	37
Kuvio 10. Normalisoitu FRET-signaali Ham's F-12 -mediumin tilavuusosuuden funktiona.	38
Kuvio 11. Normalisoitu FRET-signaali NaCl:n konsentraation funktiona.	39
Kuvio 12. $\beta$ -amyloidin kalibraatiokäyrä.	39
Kuvio 13. Olosuhteiden vaikutus signaaliin.	41
Kuvio 14. Inkuboinnin ja DMSO:n tilavuuden vaikutus signaaliin (A $\beta$ :n inkubaatiopitoisuus 15 mg/l).	44
Kuvio 15. Inkuboinnin ja DMSO:n tilavuuden vaikutus signaaliin (A $\beta$ :n inkubaatiopitoisuus 150 mg/l).	45
Kuvio 16. Inkuboinnin ja A $\beta$ -pitoisuuden vaikutus FRET-signaaliin (laimennusliuoksena Ham's F-12 -medium).	46
Kuvio 17. Inkuboinnin ja A $\beta$ -pitoisuuden vaikutus FRET-signaaliin (laimennusliuoksena 1x PBS).	47

## TAULUKOT

Taulukko 1. Pipetoidut laimennusliuokset ja niiden tilavuudet.	30
Taulukko 2. Valmistetut $\beta$ -amyloidilaimennokset eri kurkumiinipitoisuuksilla.	32
Taulukko 3. Näytteet Western blot -analyysia varten.	34
Taulukko 4. FRET-signaali inkuboimattomissa näytteissä.	42
Taulukko 5. Suolaliuoksen (10 mM HCl, 150 mM ) vaikutus A $\beta$ :n aggregoitumiseen.	48
Taulukko 6. Suolahapon (10 mM) vaikutus A $\beta$ :n aggregoitumiseen.	49
Taulukko 7. Veden vaikutus A $\beta$ :n aggregoitumiseen.	50
Taulukko 8. Kurkumiinin vaikutus A $\beta$ :n aggregoitumiseen.	51
Taulukko 9. Absorbanssimittauksen tulokset (aallonpituudella 280 nm).	53

## KÄYTETYT LYHENTEET

A $\beta$	$\beta$ -amyloidi
Alexa	Alexa Fluor 680 -väriaine
APP	amyloidiprekursoriproteiini
AT	Alzheimerin tauti
DMSO	dimetyylisulfoksidi
FRET	fluoresenssin resonanssienergian siirto
FTIR	Fourier-infrapunaspektroskopia
$\gamma$ G	gammaglobuliini
HFIP	1,1,1,3,3,3-heksafluori-2-propanoli
IR	infrapuna
PBS	fosfaattipuskuroitu suolaliuos
pI	isoelektrinen piste
SDS-PAGE	natriumdodekyylisulfaattipolyakryyliamidigeelielektroforeesi
STEM	pyyhkäisytransmissioelektronimikroskopia
TEM	transmissioelektronimikroskopia
ThT	tioflaviini T
TRF	aikaerotteinen fluoresenssi

# 1 JOHDANTO

Opinnäytetyö tehtiin Turun yliopiston biolääketieteen laitoksen biofysiikan laboratoriossa osana laajempaa kokonaisuutta, jossa tarkoituksena oli kehittää nanopartikkeliperusteinen, epäspesifinen menetelmä Alzheimerin taudin tutkimiseen.

Työn tarkoituksena oli kehittää  $\beta$ -amyloidiaggregaattien havaitsemismenetelmä. Työssä tutkittiin  $\beta$ -amyloidipeptidin ( $A\beta$ ) 1-42 aggregaatiota käyttäen aikaerotteista fluoresenssia (TRF) ja fluoresenssin resonanssienergian siirtoa (FRET). Menetelmän toimivuutta testattiin eri laimennusliuksilla käyttäen eri  $A\beta$ :n pitoisuuksia. Kirjallisuuden perusteella valittiin sellaisia laimennusliuksia, joiden tiedettiin lisäävän tai estävän  $A\beta$ :n aggregaatiota. Tutkimuksissa pyrittiin optimoimaan mittausolosuhteita sekä tutkimaan, miten eri olosuhteet vaikuttivat  $A\beta$ :n aggregoitumiseen ja miten se näkyi mitattavassa signaalissa. Lisäksi tutkimuksissa testattiin inkubointiajan vaikutusta  $A\beta$ :n aggregoitumiseen. Tämä toteutettiin inkuboimalla eri olosuhteisiin laimennettua  $A\beta$ :a 37 °C:ssa eri aikoja.

Työssä  $A\beta$ :n aggregoitumista tutkittiin valituissa laimennusliuksissa sekoita-ja-mittaa-tyyppisen menetelmän avulla. Mittauksissa tarvittavat reagenssit pipetoitiin mikrotiitterilevyn kaivoihin ja mittaukset suoritettiin monileimamittalaitteella käyttäen aikaerotteista fluoresenssia. Kehitettävä menetelmä perustui fluoresenssin resonanssienergiansiirron havaitsemiseen, kun donorina toimi Eu(III)-nanopartikkeli ja akseptorina leimattu gammaglobuliini ( $\gamma G$ ). Tutkittavat  $A\beta$ :t kilpailivat leimatun gammaglobuliinin kanssa adsorptiosta nanopartikkelien pinnalle. Mitattava signaali riippuu leimatun proteiinin määrästä Eu(III)-nanopartikkelien pinnalla.

Menetelmästä pyrittiin kehittämään muihin *in vitro* -menetelmiin verrattuna herkempi, nopeampi, halvempi ja käyttäjäystävällisempi.



## 2 PROTEIINIT JA PEPTIDIT

Proteiinit koostuvat noin 20 erilaisesta aminohaposta, jotka liittyvät toisiinsa peptidisidosten avulla. Kaikkien 20 eri aminohapon perusrakenteeseen kuuluu  $\alpha$ -hiileen liittynyt aminoryhmä, karboksyyliiryhmä ja sivuketju. Sivuketjut vaihtelevat proteiinista riippuen ja saavat aikaan proteiinien erilaiset ominaisuudet, rakenteen ja biologisen toiminnan. Proteiinin aminohappojärjestys määrää sen laskostumisen ja siten kolmiulotteisen rakenteen. (Heino & Vuento, 2007) Proteiineiksi kutsutaan sellaisia polypeptidejä, jotka koostuvat yli 50 aminohaposta, ja sitä pienempiä kutsutaan peptideiksi. Peptidit ovat avaruudelliselta rakenteeltaan proteiineja yksinkertaisempia. (McKee & McKee, 2003)

### 2.1 Proteiinien rakenne

Proteiinit koostuvat neljästä erilaisesta rakenteen tasosta. Primäärirakenteeksi kutsutaan proteiinin aminohappojärjestystä. Sekundäärirakenteella tarkoitetaan polypeptidiketjun laskoksia ja kiertymiä. Säännöllisiä sekundäärirakenteita ovat  $\alpha$ -kierre sekä  $\beta$ -laskos, toiselta nimeltään  $\beta$ -levy. Tertiäärirakenteeseen kuuluvat kovalenttiset ristisidokset, jotka vakauttavat proteiinin rakennetta ja vuorovaikutukset polypeptidiketjussa etäämpänä olevien aluiden kanssa. Neljäs proteiinin rakenteen taso on kvaternäärirakenne. Kvaternäärirakennetta tavataan yleensä proteiineissa, jotka koostuvat kahdesta tai useammasta polypeptidiketjusta. Polypeptidiketjujen yhdistelmät antavat proteiinille sellaisia ominaisuuksia, joita ei ole yksittäisillä polypeptideillä. (Heino & Vuento, 2007)

Proteiinit voivat muodostaa monia erilaisia rakenteita. Rakenteet voivat muuttua toisikseen kovalenttisia sidoksia katkaisematta. Yleensä proteiinilla on kuitenkin vain yksi pysyvä natiivirakenne. Natiivirakenne voi helposti tuhoutua erilaisten olosuhteiden, kuten korkean lämpötilan, matalan tai korkean pH:n, korkean suolapitoisuuden, säteilyn tms. vaikutuksesta. Natiivin rakenteen tuhoutumisen seurauksena on yleensä proteiinin toimintakyvyn menetys. (Heino & Vuento, 2007)

## 2.2 $\beta$ -amyloidit

$\beta$ -amyloidit ( $A\beta$ ) ovat kaikkialla elimistössä esiintyviä peptidejä, jotka muodostuvat eri entsyymien avulla amyloidiprekursoriproteiinista (APP).  $A\beta$ :t ovat noin 4 kDa kokoisia peptidejä, joiden aminohappoketjun pituus vaihtelee 39–43 aminohappoon. (Chiang ym., 2008)  $A\beta$ :n, jonka aminohappoketjun pituus on 40 tai 42 aminohappoa, teoreettinen isoelektrinen piste on 5,31 (Expasy, 2011).

Nykyisin  $A\beta$ :n kertymistä aivoihin pidetään keskeisessä roolissa Alzheimerin taudin (AT) synnyssä.  $A\beta$ :n kertyminen aivoihin johtuu mutaatioista APP:tä koodaavassa geenissä. Tästä aiheutuu APP:n prosessin häiriöitä ja siten  $A\beta$ :n kerääntymistä aivoihin.  $A\beta$ :t aggregoituvat aivoissa muodostaen liukenemattomia plakkeja, jotka monimutkaisen tapahtumaketjun kautta aiheuttavat lopulta hermosolujen kuoleman. (Chiang ym., 2008)

Hallitsevimpia  $A\beta$ :a AT:n synnyssä ovat 40 ja 42 aminohaposta koostuvat hydrofobiset amyloidit  $A\beta_{1-40}$  ja  $A\beta_{1-42}$ . *In vitro* -testeissä on osoitettu näiden  $A\beta$ :n muodostamien aggregaattien olevan erittäin neurotoksisia ja niiden on todettu estävän aivoissa elektrofysiologista aktiivisuutta, joka on tarpeen muistin muodostumiselle ja ylläpidolle. (Stine ym., 2003)

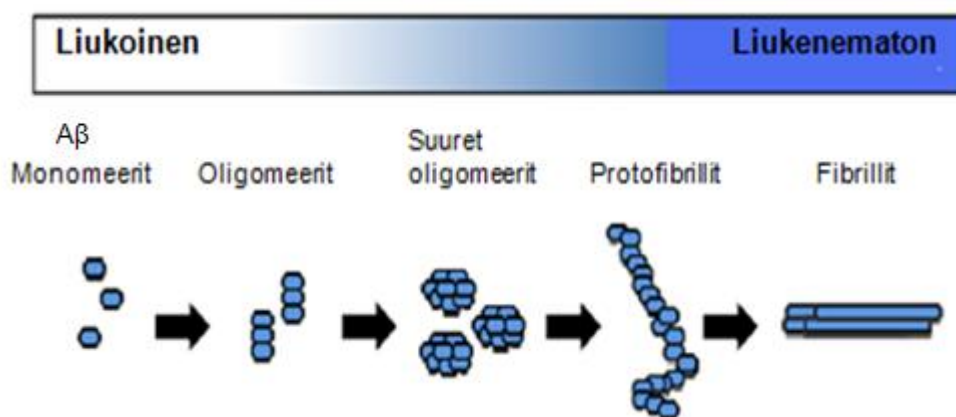
## 2.3 $\beta$ -amyloidien aggregoituminen

*In vitro* -tutkimuksissa  $A\beta$ :n aggregoituminen tapahtuu useassa eri vaiheessa. Aluksi yksittäisistä  $A\beta$ :sta muodostuu liukoisia oligomeerejä. Oligomeerit aggregoituvat protofibrilleiksi ja lopulta liukenemattomiksi,  $\beta$ -levyrakenteen omaaviksi, fibrilleiksi.  $A\beta$ :n aggregoitumisen vaiheet on esitetty kuviossa 1. Fibrillien muodostuminen on kolmivaiheinen prosessi, joka alkaa proteiinin laskostumisvirheestä. Virheellistä laskostumista seuraa nukleatio sekä lopuksi fibrillien pidentyminen. (Lee ym., 2007)

Aggregaattien muodostumiseen vaikuttavat oleellisesti  $A\beta$ :n konsentraatio sekä ympäristön pH, ionivahvuus ja lämpötila. Tarkkaa  $A\beta$ -konsentraatiota aggregaattien muodostumiselle ei ole määritelty, mutta tutkimuksissa on

osoitettu, että yksittäisistä A $\beta$ :sta koostuvia oligomeereja voi muodostua fibrilleihin verrattuna paljon pienemmissä A $\beta$ -pitoisuuksissa. pH:n taas on todettu vaikuttavan eri aggregaattien muodostumiseen siten, että oligomeereja ja protofibrillejä muodostuu helpommin neutraaleissa olosuhteissa, kun taas matala pH suosii fibrillien muodostumista. Ionivahvuuden ja lämpötilan nousun on todettu lisäävän A $\beta$ :n fibrillimuotoja. Erityisesti 37 °C:een lämpötilassa A $\beta$ :n on todettu muodostavan tiheän fibrillikannan. Lämpötilan lasku pienentää merkittävästi fibrillien määrää, kun taas pienemmissä ionivahvuuksissa fibrillejä muodostuu, mutta muodostumisnopeus on hitaampi kuin suuremmissa ionivahvuuksissa. (Lee ym., 2007)

A $\beta$ -konsentraation kasvun ja voimakkaan sekoituksen on havaittu nopeuttavan aggregaattien muodostumista. Sekoitus lisää A $\beta$ :n ja jo muodostuneiden aggregaattien törmäilyä, minkä ansiosta A $\beta$ :n reaktiiviset kompleksit osuvat helpommin toisiinsa muodostaen aggregaatteja. (Lee ym., 2007)



Kuvio 1. A $\beta$ :n aggregoitumisen vaiheet (muokattu, Amorfix life sciences, 2011).

Tutkittaessa A $\beta$ :n aggregoitumista on käytetty erilaisia liuottimia kuten vettä, dimetyylisulfoksidia (DMSO), trifluorietikkahappoa, ureaa ja erilaisia suolaliuoksia kuten fosfaattipuskuroitua suolaliuosta (PBS) ja Ham's F-12 mediumia. Näillä liuksilla on pystytty manipuloimaan A $\beta$ :n käyttäytymistä ja niillä on todettu olevan vaikutusta A $\beta$ :n aggregoitumistaipumukseen.

Esimerkiksi hyvin yleisesti käytetyn DMSO:n on todettu destabiloivan amyloidifibrillien  $\beta$ -levyrakenteita, minkä ansiosta A $\beta$ :t esiintyvät DMSO-liuoksessa suurimmaksi osaksi monomeerimuodossa. DMSO:lla on pystytty myös liuottamaan jo muodostuneita aggregaatteja. (Stine ym., 2003; Wang ym., 2006)

### 3 PROTEIINIEN ADSORPTIO

Proteiinien adsorptio erilaisiin pintoihin on hyvin yleistä. Adsorptio on monimutkainen tapahtuma ja siihen vaikuttavat pinnan ominaisuudet, proteiinin ominaisuudet sekä ympäröivät olosuhteet. Vaikutukset jaetaan entalpisiin ja entropisiin. (Quiquampoix, 2000)

Proteiinin adsorptio voidaan jakaa neljään vaiheeseen:

1. Proteiinin kulkeutuminen kohti rajapintaa diffuusion ja Brownin liikkeen vaikutuksesta. Kulkeutumisen nopeus riippuu voimakkaasti ympäröivistä olosuhteista. (Höök, 1997)
2. Proteiinin ja pinnan välinen vuorovaikutus. Vuorovaikutuksen voimakkuus määrittelee proteiinin viipymääjan kiinnittymispinnalla. (Höök, 1997)
3. Dynaaminen prosessi, joka tapahtuu proteiinin kiinnittyä pinnalle. Tähän kuuluvat proteiinin liikkeet ja proteiinimolekyylien konformaation muutokset, jotka voivat vaikuttaa vuorovaikutuksen energiaan ja proteiinin sitoutumiseen. (Höök, 1997)
4. Desorboituneiden proteiinien kulkeutuminen pois rajapinnasta. Toisinaan proteiinin ja pinnan välinen vuorovaikutus on niin voimakas, että desorptio ei onnistu. (Höök, 1997)

#### 3.1 Ulkoisten tekijöiden vaikutus proteiinien adsorptioon

Proteiinin adsorptioon vaikuttavia ulkoisia parametrejä ovat lämpötila, pH sekä ionivahvuus. Lämpötila vaikuttaa proteiinien adsorptiokinetiikkaan. Lämpötilan nosto tehostaa adsorptionopeutta, koska proteiinien liike kiihtyy ja siten ne törmäävät herkemmin kiintoaineen pintaan. Toisaalta lämpötilan nosto kasvattaa myös desorptiota, koska lämpötilaa nostettaessa molekyylien värähtely kiihtyy ja ne irtoavat helpommin pinnalta. (Rabe ym., 2011)

pH:lla on vaikutusta proteiinien varaukseen. pH:n ollessa sama kuin proteiinin isoelektrinen piste (pI), molekyylin nettovaraus on nolla, jolloin proteiini on sähköisesti neutraali. Matalassa pH:ssa ( $\text{pH} < \text{pI}$ ) proteiinit ovat positiivisesti varautuneita ja korkeassa pH:ssa ( $\text{pH} > \text{pI}$ ) negatiivisesti varautuneita. Adsorptio proteiinin ja pinnan välillä onnistuu parhaiten silloin, kun niiden varaukset ovat erimerkkiset. Tällöin molekyylien ja pinnan välillä on voimakas sähköinen vuorovaikutus, joka tehostaa adsorptiota. (Rabe ym., 2011)

Ionivahvuudella on vaikutusta proteiinin adsorptioon pinnalle erityisesti silloin, kun proteiini ja pinta ovat varautuneita. Suolan ionit muodostavat ionipilven varautuneiden pintojen ja proteiinien ylle, mikä aiheuttaa proteiinin ja pinnan vuorovaikutuksen heikkenemistä. Ionivahvuus siis heikentää proteiinin adsorptiota pinnoille. (Andrade & Hlady, 1986) Lisäksi korkea ionivahvuus lisää proteiinien taipumusta muodostaa aggregaatteja (Rabe ym., 2011).

### 3.2 Proteiinien ominaisuuksien vaikutus adsorptioon

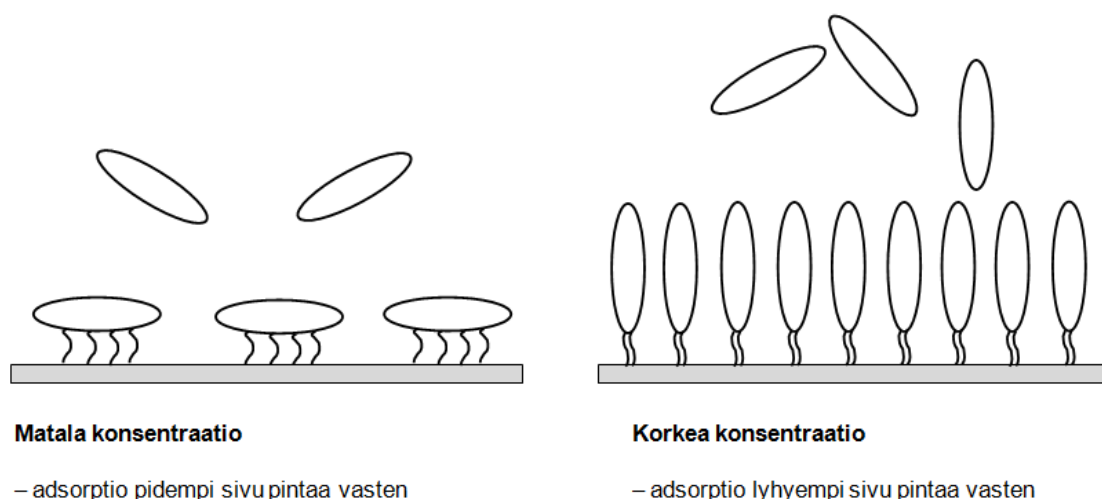
Proteiinien adsorptioon ja adsorboituneen proteiinin määrään vaikuttavia tekijöitä ovat muun muassa proteiinin koko, rakenteellinen stabiilisuus ja sitoutumiskonfiguraatio.

Proteiinin koolla on joitakin vaikutuksia adsorptioon. Pienet proteiinit diffundoituvat suurempia proteiineja nopeammin, kun taas suuret proteiinit tyypillisesti sitoutuvat voimakkaimmin pintoihin, koska niillä on suurempi kontaktipinta-ala (Rabe ym., 2011). Proteiinin suurella massalla sen sijaan voi olla negatiivisia vaikutuksia adsorboituneen proteiinin määrään pinnalla. Voimakkaat sähköstaattiset tai hydrofobiset vuorovaikutukset voivat aiheuttaa proteiinien laskostumisen purkautumisen. Tästä johtuen proteiinit levittäytyvät pinnalle ja vähemmän proteiineja pystyy adsorboitumaan. (Quiquampoix & Ratcliffe, 1992)

Adsorboituneen proteiinin määrään pinnalla vaikuttaa myös proteiinin sitoutumiskonfiguraatio. Adsorptio voi tapahtua proteiinin pidempi tai lyhyempi sivu pintaa vasten (kuvio 2). Proteiinin adsorboituessa lyhyempi sivu pintaa

vasten, suurempi määrä proteiinia pystyy sitoutumaan pinnalle verrattuna proteiinin määrään, kun sitoutuminen on tapahtunut pidempi sivu pintaa vasten. (Andrade & Hlady, 1986)

Proteiinin konsentraatiolla liuoksessa saattaa myös olla vaikutusta sitoutumiskonfiguraatioon ja adsorboituneen proteiinin määrään (kuvio 2). Joidenkin proteiinien tiedetään matalassa konsentraatiossa maksimoivan sitoutumiskohdat pinnan kanssa. Tällöin proteiinit asettuvat pinnoille pidempi sivu pintaa vasten. Suuremmassa konsentraatiossa proteiinit asettuvat lopulta lyhyempi sivu pintaa vasten, kasvattaakseen adsorboituneen proteiinin määrää. (Andrade & Hlady, 1986)



Kuvio 2. Proteiinien sitoutumiskonfiguraatio eri konsentraatioissa.

Proteiinin tietyt erityisominaisuudet vaikuttavat suuresti adsorption onnistumiseen ja nopeuteen. Näitä ovat muun muassa proteiinin hydrofiilisyyshydrofobisuus, polaarisuus ja varaus. (Rabe ym., 2011)

### 3.3 Pinnan ominaisuuksien vaikutus proteiinien adsorptioon

Proteiini-pinta-vuorovaikutukseen vaikuttaa sekä proteiinin että pinnan ominaisuudet. Huomioon otettavia pinnan ominaisuuksia ovat pinnan energia, hydrofobisuus, hydrofiilisyyshydrofobisuus, varaus ja morfologia. Proteiinien adsorptio hydrofobisille pinnoille on todennäköisempää kuin adsorptio hydrofiilisille pinnoille. Adsorptiossa systeemin entropia kasvaa ja Gibbssin energia laskee

johtuen vesimolekyylien vähentyneestä kontaktista hydrofobisen pinnan kanssa. Entropian nousu ja Gibbsin energian lasku edistävät adsorptiota. Proteiininen adsorptio hydrofiilisille pinnoille on paljon vaikeampaa, johtuen hydraattikerroksesta proteiinin ja pinnan ympärillä. (Quiquampoix, 2000)

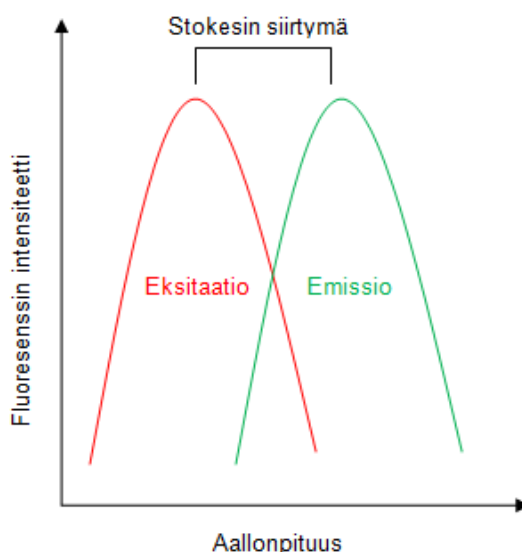
Pinnan morfologialla on vaikutusta adsorptioon ja adsorboituneen proteiinin määrään pinnalla. Yleensä pyritään valitsemaan morfologialtaan sellainen pinta, johon tutkittava proteiini adsorboituisi parhaiten. Tutkimuksista riippuen pinta-adsorptiota voidaan parantaa myös muokkaamalla pintoja siten, että proteiini adsorboituu helpommin pinnalle. (Rabe ym., 2011)



## 4 FLUOROMETRIA

Luminesenssi on valon emissiota, jota syntyy molekyylin viritystilan purkautuessa. Luminesenssi on yleisesti jaettu fluoresenssiin ja fosforesenssiin. Fluoresenssi-ilmiössä virittyneessä singlettitilassa elektronilla on vastakkainen spin alemmalla energiatasolla olevaan elektronin spiniin nähden. Tällöin elektronien sanotaan olevan parilliset. Molekyylin viritystilan purkautuessa syntyy valoa. Fosforesenssiin verrattuna fluoresenssi on nopeampi prosessi. Fosforesenssi ja fluoresenssi pystytään erottamaan toisistaan, jos niiden kesto aika voidaan mitata. (Lakowicz, 2006)

Atomit ja molekyylit absorboivat niihin kohdistettua eksitaatiovaloa tietyllä aallonpituudella ja pienen hetken kuluttua (fluoresenssin elinikä) emittoivat pidemmällä aallonpituudella matalaenergisemmän fotonin. Fluoresenssin emissionopeus on tyypillisesti  $10^8 \text{ s}^{-1}$  ja elinikä 10 ns. (Olympus Microscopy resource center, 2010) Molekyylit menettävät osan absorboituneesta energiasta sisäisiin värähtelyihin ja törmäyksiin, mistä johtuen ne eivät emittoi yhtä korkeaenergisisillä aallonpituuksilla (Gudging ym., 1995). Energiaeroa absorboituneen ja emittoituneen fotonin välillä kutsutaan Stokesin siirtymäksi, joka on kuvattu kuviossa 3 (Strasburg & Ludescher, 1995).

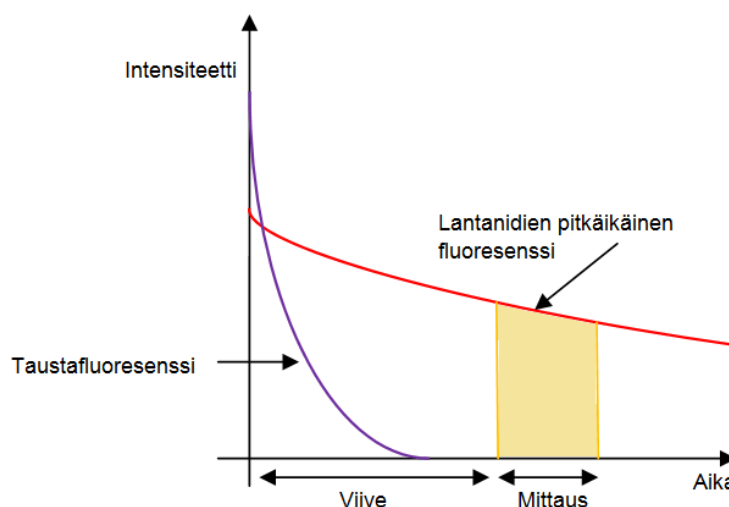


Kuvio 3. Stokesin siirtymä.

Fluoresenssiperusteiset menetelmät ovat hyvin herkkiä niille yhdisteille, jotka absorboivat riittävästi viritysvaioa synnyttääkseen fluoresenssia. Fluoresenssin tehokkuuteen vaikuttavat näytteen lämpötila, pH ja näytematriisi. Useat aineet myös sammuttavat fluoresenssia tai saattavat fluoresoida samalla aallonpituudella kuin tutkittava aine aiheuttaen taustafluoresenssia. (Jaarinen & Niiranen, 2008)

#### 4.1 Aikaerotteinen fluorometria

Monet biologiset yhdisteet ja proteiinit ovat luonnostaan fluoresoivia ja aiheuttavat taustafluoresenssia, joka häiritsee varsinaista mittausta. Aikaerotteisen fluorometrian avulla pyritään eroon tästä taustafluoresenssista. Mittauksessa eksitaatiopulssin jälkeen on viive, jonka aikana taustafluoresenssi laskee nopeasti. Aikaerotteisen fluorometrian periaate on havainnollistettu kuviossa 4. (Gudging ym., 1995)



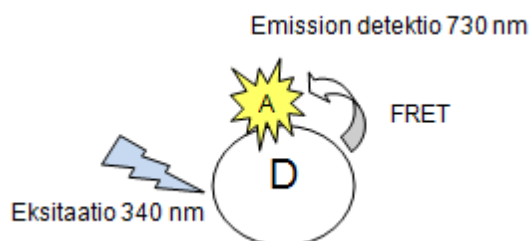
Kuvio 4. Aikaerotteisen fluorometrian periaate.

Käytetyillä fluoroforeilla tulee olla pitkäikäinen emissio. Muita tärkeitä ominaisuuksia ovat suuri intensiteetti, kapeat emissiopiikit ja suuri Stokesin siirtymä. Tällaisia fluoroforeja ovat esimerkiksi lantanidikelaatit. Yleisesti käytettyjä lantanideja ovat europium, samarium, terbium ja dysprosium. Lantanidikelaattien emission puoliintumisaika on pitkä verrattuna perinteisiin fluoroforeihin. (Cisbio Bioassays, 2009)

## 4.2 Fluoresenssin resonanssienergian siirto

Lämpösäteilyn ja molekyylien törmäilyn lisäksi, virittyneen fluoroforin energia voi purkautua energiansiirron avulla. Fluoresenssin resonanssienergian siirrossa (FRET) virittynyt fluorofori (donori) luovuttaa energiansa lähellä olevalle toiselle fluoroforille (akseptori), minkä jälkeen sen elektronit palaavat takaisin perustilaan emittoimatta fotoneja. Toisen fluoroforin emissio siis muuttuu toisen fluoroforin eksitaatioksi. Jotta FRET-ilmiö voisi tapahtua, tulee donorin emissiospektrin olla osittain päällekkäin akseptorin eksitaatiospektrin kanssa. (Clegg, 1995)

FRET:n periaate on esitetty kuviossa 5, jossa donorina toimii europium(III)polystyreenin nanopartikkeli ja akseptorina Alexa Fluor 680 -värillä leimattu gammaglobuliini.



Kuvio 5. Fluoresenssin resonanssienergian siirron periaate.

## 5 $\beta$ -AMYLOIDIAGGREGAATTIEN TUTKIMISEEN

### KÄYTETTYJÄ *IN VITRO* -MENETELMIÄ

*In vitro* -tutkimuksissa käytetään joko puhtaita peptidinäytteitä tai peptidi esiintyy yhdessä muiden komponenttien kanssa. Seuraavien menetelmien avulla voidaan  $A\beta$ :a tutkia yksinään, mutta menetelmät soveltuvat  $A\beta$ :n tutkimiseen myös muiden komponenttien läsnä ollessa. Tyypillisesti erilaisilla *in vitro* -menetelmillä pyritään tutkimaan amyloidifibrillien muodostumista ja rakennetta. (Nilsson, 2004)

Yleisimpiä tekniikoita tunnistaa ja tutkia amyloidifibrillejä ovat tioflaviini T -fluoresenssi, kongonpuna-värijäysmenetelmä, transmissioelektronimikroskopia, sekä Fourier-infrapunaspektroskopia (Nilsson, 2004). Toisinaan käytetään myös atomivoimamikroskopiaa tai Western blot -analyysiä, joilla  $A\beta$ :t ja eri aggregaatioasteet voidaan havaita (Stine ym., 2003).

#### 5.1 Tioflaviini T -detektiomenetelmä

Tioflaviini T (ThT) on bentsotiatsoliväriaine, jonka on todettu sitoutuvan  $A\beta$ :iin. Väriaineen sitoutumista voidaan tutkia fluoresenssin avulla ja mitattu signaali on verrannollinen  $A\beta$ :n määrään näytteessä. ThT-detektiomenetelmä riippuu  $A\beta$ :n morfologiasta. Tästä johtuen ThT-mittausten avulla on tutkittu yleisesti vain amyloidifibrillien muodostumista sekä *ex vivo* että *in vitro*. (Khurana ym., 2005)

Fluoresenssimittauksissa ThT:n sitoutuminen amyloidifibrilleihin havaitaan voimakkaana fluoresenssin kasvuna (noin 480 nm, kun viritys on tapahtunut 450 nm aallonpituudella). Mittauksen ongelmana on kuitenkin se, että fibrillien aiheuttama ThT-fluoresenssi voi vaihdella suuresti riippuen tutkittavasta  $A\beta$ :sta ja joillakin  $A\beta$ :lla ThT- fluoresenssi saattaa olla erittäin matala. (Sabate & Saupe, 2007)

## 5.2 Kongonpuna-detektiomenetelmä

Kongonpuna on yleisesti käytetty histologinen väri A $\beta$ :n havaitsemiseen. Kongonpuna ei sitoudu yksittäisiin A $\beta$ -peptideihin vaan ainoastaan  $\beta$ -levy rakenteen omaaviin amyloidifibrilleihin. Värjäytyneet amyloidifibrillit näkyvät normaalissa valossa punaisina, mutta polarisoidussa valossa ”omenanvihreinä” kertyminä. Värin sitoutuminen A $\beta$ :iin aiheuttaa absorbanssin nousun, joka voidaan detektoida 490–540 nm alueella. (Frida ym., 2007)

Kongonpunalla on todettu olevan ehkäisevä vaikutus amyloidifibrillien muodostumisessa. Tutkimuksissa kongonpunan on osoitettu stabiloivan A $\beta$ :n monomeerimuotoja ja siten vähentävän oligomeerien ja fibrillien pitoisuutta. Väriaineen havaittiin erityisesti vähentävän fibrillien pituutta ja niiden yhdistymistä. Pitkällä aikavälillä kongonpuna vähensi selvästi A $\beta$ -aggregaattien määrää. (Frida ym., 2007)

## 5.3 Transmissioelektronimikroskopia

Transmissioelektronimikroskopiaa (TEM) on hyödynnetty A $\beta$ :n fibrillimuotojen havaitsemisessa erilaisissa näytteissä. TEM:lla voidaan havaita aggregaatteja, jotka ovat amorfisia, pallomaisia tai fibrillejä, mutta myös rakenteita, joissa esimerkiksi useampia fibrillejä on kietoutunut yhteen köysirakenteeksi. (Nilsson, 2004)

Mikroskoopin toiminta perustuu elektronisuihkuun, joka johdetaan näytteen läpi. Osa näytteeseen törmänneistä elektroneista muuttaa suuntaansa eli siroaa. Sirona riippuu näytteen tiheydestä ja on suurinta näytteen tiheimmissä kohdissa. Tiheimmät alueet erottuvat kuvissa muita kohtia tummempina. (Solunetti, 2006) Mikroskooppikuvausta varten tutkitut näytteet negatiivivärjätään kuvan kontrastin parantamiseksi. Näytteitä voidaan värjätä muun muassa uranyyliasetaatia tai fosfovolframihappoa sisältävillä liuoksilla. (Nilsson, 2004; Solunetti, 2006)

Pyyhkäisytransmissioelektronimikroskopia (STEM) on yksi transmissioelektronimikroskopian laji. Sitä käytetään A $\beta$ :n aggregaattien syntymekanismin tutkimuksessa ja syntyneiden aggregaattien rakennetutkimuksissa. STEM on ainut menetelmä, jonka avulla voidaan määrittää suoraan muodostuneiden amyloidifibrillien massa pituusyksikköä kohden (kDa/nm). (Goldsbury ym., 2011)

#### 5.4 Fourier-infrapunaspektroskopia

Fourier-infrapunaspektroskopiaa (FTIR) käytetään A $\beta$ :n  $\beta$ -levysekundaarirakenteiden havaitsemiseen. Yleensä näytteet tutkitaan ennen ja jälkeen aggregoitumisen ja lisääntyneiden  $\beta$ -levyrakenteiden muodostuminen liitetään amyloidifibrillien muodostumiseen. (Nilsson, 2004)

Infrapunaspektroskopiamittausten avulla voidaan määrittää molekyylien rakennetta ja minkälaisilla sidoksilla atomit yhdistyvät toisiinsa. Tutkituilla näytteillä, tässä tapauksessa A $\beta$ :lla, on ominainen infrapunaspektri (IR-spektri) ja tunnistaminen tapahtuu vertailemalla spektriä referenssispektreihin. (Jaarinen & Niiranen, 2008)

IR-spektrin karakteristiset piirteet riippuvat tutkitun molekyylin rakenteesta. Analytiikassa käytetään aallonpituusaluetta 2–50  $\mu\text{m}$ . Absorptiomaksimit ilmoitetaan aaltolukuina eli aallonpituuden käänteisarvoina. A $\beta$ :n sekundaarirakenteet voidaan havaita spektrin muutoksina aaltoluvuilla 1600–1700  $\text{cm}^{-1}$ . (Nilsson, 2004; Jaarinen & Niiranen, 2008)

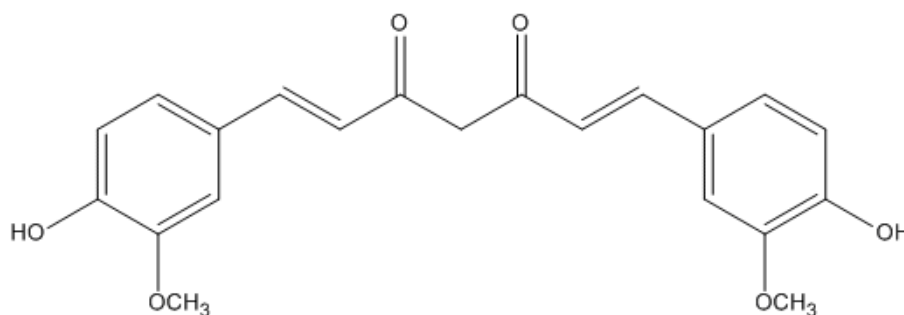
#### 5.5 Western blot -analyysi

Western blot -analyysillä voidaan tunnistaa proteiineja kalvolta leimattujen vasta-aineiden avulla. Ennen analyysia tutkittavat proteiinit erotetaan toisistaan elektroforeesin avulla. Menetelmällä voidaan määrittää tutkittujen proteiinien molekyylipainot. Western blot -analyysillä on mahdollista saada näkyviin A $\beta$ :n eri aggregaatioasteita ja määrittää eri aggregaatiomuotojen koko. (Stine ym., 2003)

## 6 MATERIAALIT JA LAITTEET

### 6.1 Kurkumiini

Kurkumiini (engl. curcumin) on keltainen väriaine, jota saadaan kuivatuista *Curcuma Longa* -kasvin juurakoista. Kurkumiinilla on todettu olevan useita lääkinnällisiä ominaisuuksia. Viimeisimpien tutkimusten mukaan kurkumiinin on todettu jossain määrin ehkäisevän Alzheimerin tautiin liittyvää  $\beta$ -amyloidien ( $A\beta$ ) aggregaatiota (Ono ym., 2004). Kuviossa 6 on esitetty kurkumiinin rakenne. (Benassi ym., 2008)



Kuvio 6. Kurkumiinin rakenne (Benassi ym., 2008).

Aikaisemmissa *in vitro* -tutkimuksissa on todettu kurkumiinin ja sen johdannaisten estävän  $A\beta$ :aa muodostamasta protofibrillejä. Lisäksi samoissa tutkimuksissa on havaittu kurkumiinin destabiloivan jo syntyneitä protofibrillejä ja aiheuttavan niiden hajoamista. (Benassi ym., 2008, Zijian ym., 2010)

### 6.2 Alexa Fluor 680 -värillä leimattu gammaglobuliini

Gammaglobuliinit ( $\gamma$ G) ovat veren proteiineja, jotka voidaan elektroforeettisesti erotella muista jaokkeista.  $\gamma$ G:t sisältävät suurimman osan seerumin vasta-aineista (immunoglobuliineista). (Duodecim Terveyskirjasto, 2011) Työssä käytetty  $\gamma$ G oli eristetty naudan verestä ja sen isoelektrinen piste on väliltä 6,4–8,8 (Condie, 1981). Alexa Fluor 680 (Alexa) -väri on LifeTechnologiesin kehittämä fluoresoiva väriaine, jolla on hyvä vesiliukoisuus.

Työssä käytettiin akseptorina Alexa-väriaineella leimattua gammaglobuliinia (valmistettu Biofysiikan laboratoriossa). Leimauksessa lisätyn väriaineen ainemäärä vastasi 10-kertaista ylimäärää  $\gamma$ G:iin nähden. Alexa-leimatun  $\gamma$ G:n leima-aste oli 4 ja pitoisuus 0,80 g/l.

### 6.3 Nanopartikkelit

Tutkimuksissa kiintokantajina toimivat pinnalta karboksylaattimodifioidut Eu(III)-polystyreenin nanopartikkelit (Seradyn Inc., Indianapolis, IN), joiden halkaisija oli 68 nm. Nanopartikkelien pinta oli varaukseltaan negatiivinen. Määrittelyssä akseptorina toimivat Alexa-väriaineella leimatut  $\gamma$ G:t tai A $\beta$ :t adsorboituivat partikkelien pinnalle.

### 6.4 Victor<sup>2</sup>-monileimamittalaite

Fluoresenssin detektiossa käytettiin Victor<sup>2</sup> monileima mittalaitetta (Wallac, PerkinElmer Life and Analytical Sciences, Turku, Suomi). Mittalaite soveltuu erilaisiin fluorometrisiin (esim. aikaerotteinen fluorometria), luminometrisiin ja fotometrisiin mittauksiin.

### 6.5 NanoDrop 1000 -spektrofotometri

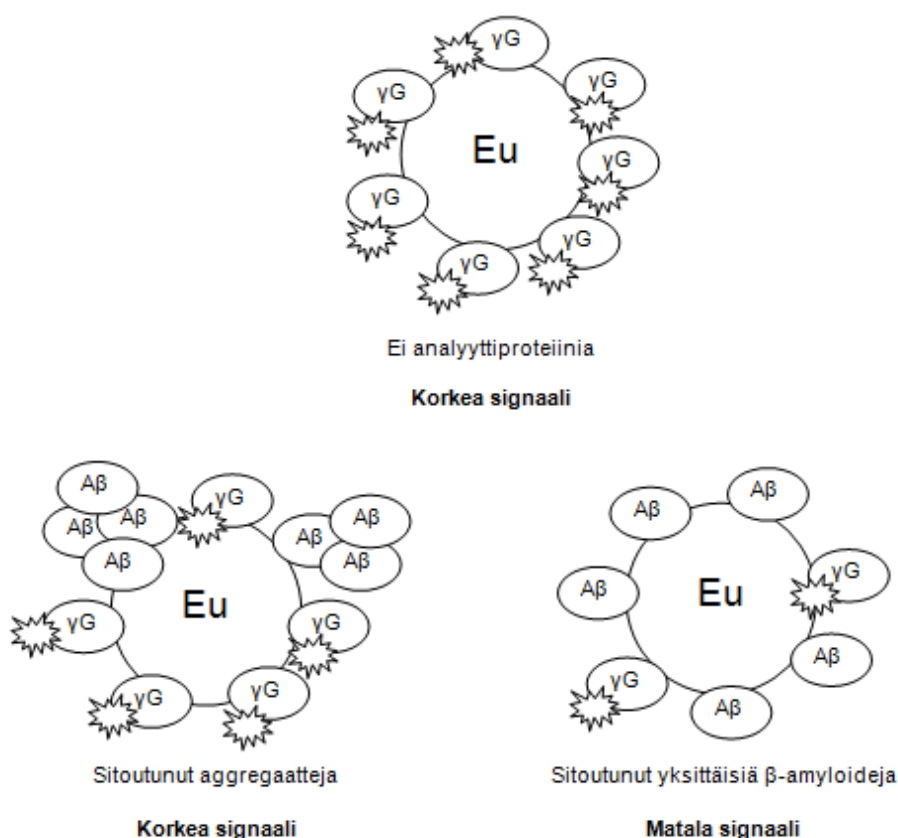
NanoDrop 1000 -spektrofotometrillä (Thermo Scientific, Wilmington, NC) voidaan tutkia peptidin ja mahdollisten aggregaattien olemassaoloa näytteissä mittaamalla absorbanssi aallonpituudella 280 nm. Spektrofotometrillä voidaan mitata tilavuudeltaan 1  $\mu$ l:n näytteitä hyvällä tarkkuudella. Fluoresenssimittauksiin nähden huomattavan herkkyuden vuoksi laitteella voidaan mitata vain suhteellisen väkeviä näytteitä. Mittaukseen ei tarvita kyvettä, vaan näyte pysyy paikallaan pintajännityksen avulla. (Thermo Scientific, 2008)



## 7 MENETELMÄT

Menetelmä perustuu fluoresenssin resonanssienergian siirron havaitsemiseen aikaerotteisesti (TR-FRET). Akseptorina toimivat Alexa-väriaineella leimatut  $\gamma$ G:t adsorboituvat Eu(III)-polystyreenin nanopartikkelien pinnalle. Menetelmässä viritetään donorina toimivat Eu(III)-partikkelit, jotka siirtävät energiaa leimatulle gammaglobuliinille. Akseptorin herkistettyä emissiota mitataan aikaerotteista fluorometriaa käyttäen.

$A\beta_{1-42}$  ja sen aggregaatit kilpailevat leimatun gammaglobuliinin kanssa adsorboitumisesta Eu(III)-partikkelien pinnalle. Mitattava signaali vaihtelee suhteessa leimatun proteiinin määrään Eu(III)-partikkelien pinnalla. Mitä enemmän leimattua proteiinia on adsorboitunut sitä korkeampi on mitattava signaali. Menetelmän periaatetta on havainnollistettu kuviossa 7.



Kuvio 7. Kilpaileva määrittäminen.

### 7.1 Määrityksen suoritus

Määritykset suoritettiin pääsääntöisesti käyttäen 96-mikrotiitterilevyjä (keltainen, Nunc, Rochester, NY), joihin lisättiin puskuria, A $\beta$ :a erilaisissa laimennusliuksissa, nanopartikkeleita ja leimattua  $\gamma$ G:a. Puskurina jokaisessa määrityksessä käytettiin 5 mM glysiinipuskuria, jonka pH oli 2,0. Jokaisessa määrityksessä mikrotiitterilevyn kaivoihin pipetoitiin 10  $\mu$ l veteen laimennettuja Eu(III)-partikkeleita ( $2,7 \times 10^6/\mu$ l) ja 10  $\mu$ l veteen laimennettua Alexa-värillä leimattua  $\gamma$ G:a (0,8 mg/l). Määrityksissä käytettiin ultrapuhdasta milli-Q-vettä. Partikkelien ja  $\gamma$ G:n lisäyksen jälkeen näytteitä sekoitettiin kuoppalevyravistelijalla.

Mittaukset suoritettiin Victor<sup>2</sup>-monileima mittalaitteella käyttäen 340 nm eksitaatioaallonpituutta ja 730 nm emissioaallonpituutta. Mittauksen viiveaika oli 75  $\mu$ s ja mittaus kesti 50  $\mu$ s.

### 7.2 Alexa Fluor 680 -värillä leimatun gammaglobuliinin pitoisuuden optimointi

Tulevia määrityksiä varten optimoitiin Alexa-värillä leimatun  $\gamma$ G:n pitoisuus.  $\gamma$ G:sta valmistettiin 0,20; 0,40; 0,80 ja 1,6 mg/l laimennokset veteen. Pipetoitiin 70  $\mu$ l glysiinipuskuria (5,0 mM, pH = 2,0) 96-mikrotiitterilevyn kaivoihin kahdet rinnakkaiset. Lisättiin kaivoihin 10  $\mu$ l jokaista laimennosta ja 10  $\mu$ l Eu(III)-partikkeleita. Suoritettiin mittaus Victor<sup>2</sup>-monileimamittalaitteella.

### 7.3 Eri olosuhteiden vaikutus leimatun gammaglobuliinin adsorptioon

Dimetyylisulfoksidin (DMSO), Ham's F-12 -mediumin ja suolapitoisuuden vaikutus  $\gamma$ G:n adsorptioon on esitetty seuraavissa kappaleissa. Kokeissa ei erikseen testattu veden tai 10 mM suolahapon vaikutusta adsorptioon, vaikka niitä käytettiin myöhemmissä kokeissa.

### 7.3.1 Dimetyylisulfoksidi

Testattiin DMSO:n (Labscan Ltd., Dublin, Irlanti) vaikutusta Alexa-värillä leimatun  $\gamma$ G:n adsorptioon Eu(III)-partikkelien pinnalle. Valmistettiin DMSO-laimennokset glysiinipuskuriin (5 mM, pH = 2,0), jolloin DMSO:n tilavuusosuus näytteissä oli 0; 0,10; 0,30; 1,0; 3,0; 10 ja 30 %. Pipetoitiin mikrotiitterilevyn kaivoihin 70  $\mu$ l DMSO-laimennoksia kolmet rinnakkaiset, nanopartikkeleita ja gammaglobuliinia ja suoritettiin mittauss.

### 7.3.2 Ham's F -12 medium

Testattiin Ham's F -12 mediumin (ei sisällä L-glutamiinia tai fenolinpunaista, PromoCell, Heidelberg, Saksa) vaikutusta gammaglobuliinin adsorptioon Eu(III)-partikkelien pinnalle. Valmistettiin Ham's F -12 mediumista laimennokset glysiinipuskuriin (5 mM, pH = 2,0) siten, että näytteissä oli mediumia 0; 0,0010; 0,010; 0,10; 1,0; 10 ja 30 %. Pipetoitiin mikrotiitterilevyn kaivoihin 70  $\mu$ l Ham's F-12 -laimennoksia kolmet rinnakkaiset. Lisättiin nanopartikkelit ja gammaglobuliini ja suoritettiin mittauss.

### 7.3.3 Suolapitoisuus

Testattiin eri suolapitoisuuksien vaikutusta adsorptioon Eu(III)-partikkelien pinnalle. Suolana käytettiin natriumkloridia. Laimennettiin natriumkloridia glysiinipuskuriin siten, että näytteiden suolapitoisuudet olivat 0; 0,50; 1,5; 5,0; 15; 50 ja 150 mM. Pipetoitiin mikrotiitterilevyn kaivoihin 70  $\mu$ l eri suolapitoisuuden omaavia laimennoksia kolmet rinnakkaiset. Lisättiin nanopartikkelit ja gammaglobuliini ja suoritettiin mittauss.

## 7.4 $\beta$ -amyloidinäyteputkien valmistus

Tutkimuksia varten valmistettiin 600 kappaletta  $A\beta_{1-42}$ :a (Biosite, Fremont, CA) sisältäviä mikrosentrifugiputkia. Liuotettiin 0,5 mg kylmäkuivattua  $A\beta_{1-42}$ :a 1,5 ml:aan 1,1,1,3,3,3-heksafluori-2-propanolia (HFIP, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Annettiin  $A\beta_{1-42}$ :n liueta 30 minuuttia, jonka aikana liukenemista

tehostettiin käyttämällä ultraäänisonikaattoria (Finnsonic, Lahti, Suomi) 5 minuuttia. Lisättiin liuenneen  $A\beta_{1-42}$ :n joukkoon vielä 1,6 ml HFIP:tä ja siirrettiin liennut  $A\beta_{1-42}$  pieneen lasipulloon. Pipetoitiin 0,5 ml:n mikrosentrifugiputkiin 5  $\mu$ l  $A\beta_{1-42}$ -liuosta ja haihdutettiin HFIP pois pitämällä putket avoinna vetokaapissa huoneenlämmössä yön yli.  $A\beta_{1-42}$ :a oli 0,81  $\mu$ g putkea kohden. Putkia säilytettiin  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ :ssa.

## 7.5 Inkubointiajan vaikutus $\beta$ -amyloidien aggregoitumiseen

Inkubointiajan vaikutusta  $A\beta$ :n aggregoitumiseen testattiin pääsääntöisesti jokaisessa mittauksessa. Inkubointi suoritettiin ennen näytteiden pipetointia mikrotiiterilevylle.  $A\beta$  laimennettiin tutkittavaan olosuhteeseen haluttuun pitoisuuteen. Näytteet jaettiin useampaan mikrosentrifugiputkeen, jotka laitettiin inkuboitumaan  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ :seen. Näytteitä inkuboitui määrätyksestä riippuen 2 tunnista 5 vuorokauteen. Tulosten vertailun vuoksi jokaisessa määrityksessä mittaus suoritettiin myös inkuboimattomista näytteistä. Määritysteknisistä syistä johtuen inkuboimattomista näytteistä mittaukset on suoritettu 30-50 minuutin jälkeen testien aloittamisesta.

## 7.6 $\beta$ -amyloidipitoisuuden vaikutus aggregaatioon ja menetelmän toimintaan

$A\beta$ :n pitoisuuden vaikutusta aggregaatioon ja menetelmän toimivuuteen tutkittiin käyttämällä eri pitoisuuksia inkubaatiossa ja mittauksissa. Kokeiden suoritukset on esitelty seuraavissa kappaleissa.

### 7.6.1 $\beta$ -amyloidin pitoisuuden vaikutus aggregaatioon – pitoisuus inkubaatiossa

$A\beta$ :n pitoisuutta vaihdeltiin näytteissä, jotta voitiin havainnoida, miten  $A\beta$ -pitoisuus vaikutti aggregaatioon käytetyissä inkubointiolosuhteissa ja -ajoissa. Määrityksiä varten yleensä yhden tai useamman peptidiputken sisältämä  $A\beta$  liuotettiin yhteensä 5–10  $\mu$ l vedetöntä DMSO:a (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Tämä tapahtui siten, että ensimmäiseen amyloidiputkeen lisättiin haluttu määrä DMSO:a.  $A\beta$ :n liukenemista parannettiin sonikoimalla putkea

ultraäänisonikaattorissa 2 minuuttia. Koko putken sisältö siirrettiin seuraavaan A $\beta$ :a sisältävään putkeen ja toistettiin sonikointi, kunnes kaikki peptidiputket oli yhdistetty.

Tämän jälkeen A $\beta$ -liuosta laimennettiin eri laimennusliuksilla, jotta inkubaatioon saatiin haluttu A $\beta$ -pitoisuus. Käytetyt A $\beta$ -pitoisuudet olivat määrityksestä riippuen 7,3–150 mg/l. Poikkeuksena fluoresenssiin nähden epäherkemmissä spektrofotometrimittauksissa käytettiin suurempaa pitoisuutta 340 mg/l, jotta A $\beta$ :t ja aggregaatit voitiin havaita.

#### 7.6.2 $\beta$ -amyloidin kalibraatiokäyrä – pitoisuus kaivossa

Mittauksia varten täytyi määrittää sopiva A $\beta$ -pitoisuus kaivossa. Tutkimusta varten liuotettiin yhden A $\beta$ -putken sisältämä peptidi 10  $\mu$ l DMSO:a, jolloin A $\beta$ :n pitoisuus putkessa oli 0,081 g/l. Amyloidin liukenemista DMSO:hon edistettiin käyttämällä ultraäänisonikaattoria 10 minuuttia.

Valmistettiin amyloidiliuoksesta laimennokset kylmään veteen siten, että A $\beta$  loppupitoisuus kaivossa oli 0–2300  $\mu$ g/l. Pipetoitiin mikrotiitterilevyn kaivoihin 70  $\mu$ l glysiinipuskuria (5 mM, pH = 2,0). Kaivoihin lisättiin 2  $\mu$ l jokaista A $\beta$ -laimennosta kolmet rinnakkaiset. Lisättiin jokaiseen kaivoon Eu(III)-partikkeleita ja leimattua gammaglobuliinia ja suoritettiin mittaus.

#### 7.7 Olosuhteiden vaikutus $\beta$ -amyloidien adsorptioon

Testattiin käytettyjen olosuhteiden vaikutusta peptidin adsorptioon Eu(III)-partikkelien pinnalle. Tutkimusta varten yhdistettiin 25 A $\beta$ -putken sisältö 6  $\mu$ l DMSO:a. Viimeisessä putkessa A $\beta$ :n loppupitoisuus oli 3,4 g/l.

Pipetoitiin veteen tehtyä A $\beta$ -laimennusta 0,75  $\mu$ l jokaiseen kaivoon, jolloin A $\beta$ -pitoisuus kaivossa oli 180  $\mu$ g/l. Jokaisesta testattavasta liuoksesta (taulukko 1) mitattiin kolme rinnakkaista näytettä. Vertailunäytteinä käytettiin näytettä, johon ei pipetoitu A $\beta$ :a ollenkaan ja näytettä, johon pipetoitiin A $\beta$ :a, mutta ei mitään laimennusliuosta. Lisättiin kaivoihin partikkelit ja leimattu gammaglobuliini

nopeasti, jotta amyloidien mahdollista aggregoitumista ei ehtinyt tapahtua. Suoritettiin mittausta normaalisti monileimamittalaitteella.

Taulukko 1. Pipetoidut laimennusliuokset ja niiden tilavuudet.

<b>Liuos</b>	<b>Kaivoon pipetoitu tilavuus (µl)</b>
Ham's F-12	4
DMSO	5
1x PBS	5
10 mM HCl, 150 mM NaCl	5
50 µM kurkumiini	0,5

## 7.8 Olosuhteiden vaikutus $\beta$ -amyloidien aggregoitumiseen

Ennen mittausten suorittamista yhdistettiin 18 A $\beta$ -putken sisältö 10 µl:aan DMSO:a. Yhdistämisen jälkeen viimeisessä putkessa A $\beta$ -pitoisuus oli 1,5 g/l. Tämän jälkeen A $\beta$ -liuosta laimennettiin valittuihin olosuhteisiin, jotta saatiin haluttu pitoisuus inkubaatioon. Koska peptidi liuotettiin alun perin DMSO:hon, näytteet sisälsivät 1–10 % DMSO:ta. Inkubaation jälkeen ennen mikrotiitterilevyn kaivoihin pipetoimista amyloidit laimennettiin veteen sopivaan pitoisuuteen. Valitut pitoisuudet kaivoissa olivat välillä 200–1800 µg/l. Tuloksia vertailtiin näytteeseen, johon ei lisätty ollenkaan peptidiä eikä mitään laimennusliuosta.

### 7.8.1 Dimetyylisulfoksidi

DMSO:n vaikutusta A $\beta$ :n aggregoitumiseen testattiin vaihtelemalla DMSO-pitoisuutta ja A $\beta$ :n pitoisuutta näytteissä. A $\beta$ -liuosta laimennettiin eri DMSO-pitoisuuksiin. A $\beta$ -pitoisuuden ollessa 15 mg/l, valmistettiin näytteet, joissa DMSO:a oli 1,0–97 %. Pitoisuuden ollessa 150 mg/l taas valmistettiin näytteet, joissa DMSO:a oli 11–97 %. Jaettiin näytteet useampaan

mikrosentrifugiputkeen ja laitettiin osa inkuboitumaan. Näytteitä inkuboitiin 2–17 tuntia.

Laimennettiin inkuboimattomat tai inkuboidut näytteet veteen sopivaan pitoisuuteen ja pipetoitiin kaivoihin siten, että A $\beta$ :n loppupitoisuus kaivoissa oli 500  $\mu$ g/l. Pipetoitiin mikrotiitterilevyn kaivoihin glysiinipuskuria, nanopartikkeleita ja leimattua gammaglobuliinia ja suoritettiin mittaukset.

#### 7.8.2 Ham's F-12 -medium

A $\beta$ :a laimennettiin Ham's F-12 -mediumiin siten, että A $\beta$ -pitoisuudet olivat 15 ja 150 mg/l. Näytteet jaettiin useampaan mikrosentrifugiputkeen ja osa laitettiin inkuboitumaan. Inkuboitiin näytteitä 5 vuorokautta. Laimennettiin inkuboimattomat tai inkuboidut näytteet sopivaan pitoisuuteen ja pipetoitiin näytteitä kaivoihin siten, että A $\beta$ :n loppupitoisuus kaivoissa vaihteli välillä 200–1800  $\mu$ g/l. Pipetoitiin mikrotiitterilevyn kaivoihin glysiinipuskuria, nanopartikkeleita, leimattua gammaglobuliinia ja suoritettiin mittaukset.

#### 7.8.3 Fosfaattipuskuroitu suolaliuos, vesi, suolaliuos (10 mM HCl, 150 mM NaCl) ja suolahappo (10 mM HCl)

A $\beta$ -liuosta laimennettiin 1x PBS:ään siten, että A $\beta$ -pitoisuudet näytteissä olivat 15 ja 150 mg/l. Laimennettaessa amyloidia veteen, suolaliuokseen (10 mM HCl, 150 mM NaCl) tai 10 mM HCl:ään käytetyt A $\beta$ -pitoisuudet olivat 7,3; 15 ja 150 mg/l.

Jaettiin näytteet useampaan mikrosentrifugiputkeen ja laitettiin osa inkuboitumaan. Inkuboitiin näytteitä määräyksestä riippuen 3 tai 5 vuorokautta. Laimennettiin inkuboimattomat tai inkuboidut näytteet sopivaan pitoisuuteen ja pipetoitiin kaivoihin siten, että A $\beta$ -loppupitoisuus kaivossa vaihteli välillä 200–1800  $\mu$ g/l. Pipetoitiin mikrotiitterilevyn kaivoihin puskuria, nanopartikkeleita ja leimattua leimattua gammaglobuliinia ja suoritettiin mittaukset.

#### 7.8.4 Kurkumiini

Kurkumiinin (Tocris, Ellisville, MO) kykyä estää A $\beta$ :n aggregoitumista testattiin käyttäen eri kurkumiini- ja A $\beta$ -pitoisuuksia. Liuotettiin kurkumiinijauhetta veteen siten, että saatiin 10 mM kurkumiinia sisältävä liuos. Aggregoitumatonta A $\beta$ :a DMSO:ssa laimennettiin erilaisiin liuoksiin, jotka sisälsivät eri pitoisuuksia kurkumiinia. Taulukossa 2 on esitetty käytetyt laimennusliuokset, A $\beta$ -pitoisuudet inkubaatiossa ja kurkumiinipitoisuudet. A $\beta$ -liuokset jaettiin useampaan mikrosentrifugiputkeen ja laitettiin osa inkuboitumaan. Näytteitä inkuboitin 3 vuorokautta. Laimennettiin inkuboimattomat tai inkuboidut näytteet sopivaan pitoisuuteen siten, että pitoisuudet kaivoissa vaihtelivat välillä 200–550  $\mu$ g/l. Pipetoitiin mikrotiitterilevyn kaivoihin puskuria, laimennettua  $\beta$ -amyloidikurkumiiniliuosta, nanopartikkeleita ja leimattua gammaglobuliinia ja suoritettiin mittaukset.

Taulukko 2. Valmistetut  $\beta$ -amyloidilaimennokset eri kurkumiinipitoisuuksilla.

Olosuhde	c(A $\beta$ ) (mg/l)	C(kurkumiini) ( $\mu$ M)
Vesi	7,3	50
	15	50
	150	30, 300
DMSO	150	30, 300
1x PBS	7,3	50
	15	50
10 mM HCl, 150 mM NaCl	7,3	50
	15	50
	150	30, 300
10 mM HCl	7,3	50
	15	50



## 7.9 $\beta$ -amyloidien tutkiminen spektrofotometrillä

Tutkittiin NanoDrop 1000 -spektrofotometrillä  $A\beta$ :n ja mahdollisten aggregaattien olemassaoloa näytteissä. Yhdistettiin 25  $A\beta$ -putken sisältö 6  $\mu$ l DMSO:a. Viimeisessä putkessa  $A\beta$ -pitoisuus oli 3,4 g/l. Valmistettiin  $A\beta$ :sta laimennokset aikaisempien kokeiden perusteella DMSO:hon, veteen ja suolaliuokseen (10 mM HCl, 150 mM NaCl) siten, että  $A\beta$ :n loppupitoisuus oli 340 mg/l. Olosuhteet valittiin sen perusteella, että amyloidien aggregoituminen näissä olosuhteissa vaihteli.

Jaettiin jokainen  $A\beta$ -liuos kahteen mikrosentrifugiputkeen, joista toinen laitettiin inkuboitumaan ja toiset näytteet mitattiin heti. Ennen mittausta laskettiin käytetylle  $A\beta$ :lle teoreettinen absorbanssi (A) käyttämällä kaavaa:

$$A = \epsilon cl$$

Kaavassa  $\epsilon$  on absorptiokerroin, joka käytetylle 1-42  $A\beta$ :lle oli  $0,330 \text{ l g}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (Expasy, 2011)  $c$  on näytteen konsentraatio (g/l) ja  $l$  liuoksen paksuus (1 cm). Käytetyn 1-42 amyloidin laskennallinen absorbanssi oli 0,11.

Spektrofotometriin pipetoitiin 2  $\mu$ l:n näyte ja mittaus suoritettiin aallonpituudella 280 nm. Amyloidiliuosten lisäksi mitattiin myös käytettyjen laimennusliuosten absorbanssi, jotta saatiin selville, miten ne vaikuttavat tuloksiin. DMSO:n todettiin aiheuttavan suuren taustan signaaliin, joten ennen spektrofotometriin pipetointia amyloidiliuos laimennettiin 1:1 veteen.

## 7.10 Western blot -analyysi

Tutkittiin Western blot -analyysillä amyloidien aggregoitumista. Tutkimuksissa käytettiin muista mittauksista poiketen  $A\beta_{1-40}$ :tä (AnaSpec Inc., Fremont, CA). Liuotettiin 0,5 mg kylmäkuivattua  $A\beta_{1-40}$  250  $\mu$ l HFIP:a. Annettiin  $A\beta$ :n liueta 30 minuuttia, jonka aikana liukenemista tehostettiin käyttämällä ultraäänisonikaattoria 5 minuuttia. Pipetoitiin 24 lasipulloon 10  $\mu$ l liuotettua  $A\beta$ :a ja haihdutettiin HFIP jättämällä lasipullot avonaisiksi vetokaappiin

huoneenlämpöön yön yli. Valmistettiin taulukossa 3 esitetyt näytteet Western blot -analyysia varten.

Taulukko 3. Näytteet Western blot -analyysia varten.

Olosuhde	Pitoisuus inkuboidessa c(A $\beta$ ) (mg/l)	Inkubointiaika
DMSO	150	30 min
vesi	150	30 min
DMSO	150	3 d
vesi	150	3 d
10 mM HCl, 150 mM NaCl	15	3 d
1x PBS	150	3 d

Näytteet tutkittiin yhteistyönä toisen tutkimusryhmän tutkijan (Francisco Lopez) kanssa. Western blot -analyysi suoritettiin pääpiirteittäin seuraavalla tavalla. Elektroforeettista proteiinien erotusta varten näytteet pipetoitiin 18-prosenttiselle akryyliamidiminigeelille. Proteiinit eroteltiin elektroforeettisesti olosuhteissa, joissa denaturaatiota ei tapahtunut. SDS-PAGE-ajon jälkeen näytteet siirrettiin polyvinylideenifluoridikalvolle (Immobilon-P, Millipore Corp., Bedford, MA) käyttäen puolikuivaa siirtosysteemiä (Transblot SD, Bio-Rad, Hercules, CA). Tämän jälkeen kalvo inkuboitii yön yli +4 °C lämpötilassa yhdessä primäärisen polyklonaalisen anti-A $\beta$ -vasta-aineen kanssa (Convance, Princeton, NJ). Tämän jälkeen kalvo pestiin ja sitä inkuboitii huoneenlämmössä tunnin ajan yhdessä HRP-konjukoidun sekundäärisen vasta-aineen kanssa. Näytteet saatiin filmille (Hyperfilm ECL, Amersham) käyttäen kemiluminesenssi-ECL-systeemiä (Amersham, Buckinghamshire, Iso-Britannia).

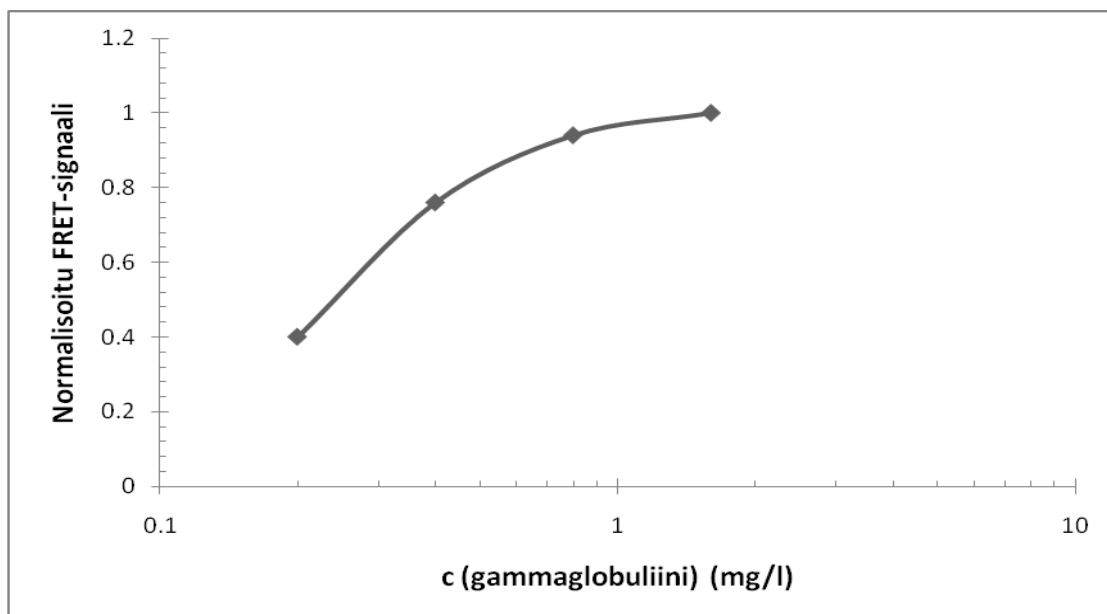
## 8 TULOKSET JA ARVIOINTI

Seuraavissa kappaleissa on esitetty kokeissa saadun tulokset ja niiden perusteella tehdyt arvioinnit. Määritysten tulokset on esitetty normalisoituina FRET-signaaleina. Normalisoitu signaali saatiin, kun FRET-signaaleja vertailtiin nollanäytteisiin (signaalien suhde), jotka koostuivat käytetystä puskurista, nanopartikkeleista ja leimatusta gammaglobuliinista. Nollanäytteen suhdeluku oli siten aina yksi. Jos signaali oli nollanäytettä korkeampi, suhdeluku oli  $> 1$  ja jos signaali oli nollanäytettä pienempi, suhdeluku oli  $< 1$ . Mitä suurempi suhdeluku oli sitä enemmän leimattua proteiinia oli adsorboitunut Eu(III)-partikkelien pinnalle.

### 8.1 Leimatun gammaglobuliinin pitoisuuden optimointi

Kokeen tarkoituksena oli optimoida leimatun gammaglobuliinin pitoisuus eri määrittelyissä. Kuviosta 8 voidaan havaita, että gammaglobuliinipitoisuuden ollessa suurin, signaali oli korkein. Pienemmillä pitoisuuksilla signaali laski. Tämän perusteella voitiin todeta, että leimattu gammaglobuliini adsorboitui Eu(III)-partikkelien pinnalle ja energiansiirto tapahtui. Mitä enemmän leimattua proteiinia näytteessä oli, sitä enemmän sitä adsorboitui partikkelien pinnalle ja sitä korkeampi oli signaali.

Leimatun gammaglobuliinin pitoisuus pyrittiin optimoimaan mahdollisimman pieneksi, mutta kuitenkin niin, että saatiin partikkelien pinta täyttymään mahdollisimman hyvin ja siten korkea signaali. Kun leimatun gammaglobuliinin pitoisuus on pieni, A $\beta$ :n/aggregaattien läsnäolo voidaan havaita mahdollisimman herkästi, koska partikkelin pinnalla oleva adsorboitunut A $\beta$  ei vaihdu niin helposti  $\gamma$ G:iin. Kirjallisuuden perusteella adsorboitunut proteiini desorboituu helpommin, jos sen kanssa tuodaan kosketuksiin liuos, jonka proteiinipitoisuus on suuri (Ball ym., 2003). Tästä johtuen  $\gamma$ G:n pitoisuus pyrittiin optimoimaan minimiin. Tulosten perusteella käytettäväksi gammaglobuliinipitoisuudeksi valittiin 0,8 mg/l.



Kuvio 8. Normalisoitu FRET-signaali leimatun gammaglobuliinin pitoisuuden funktiona.

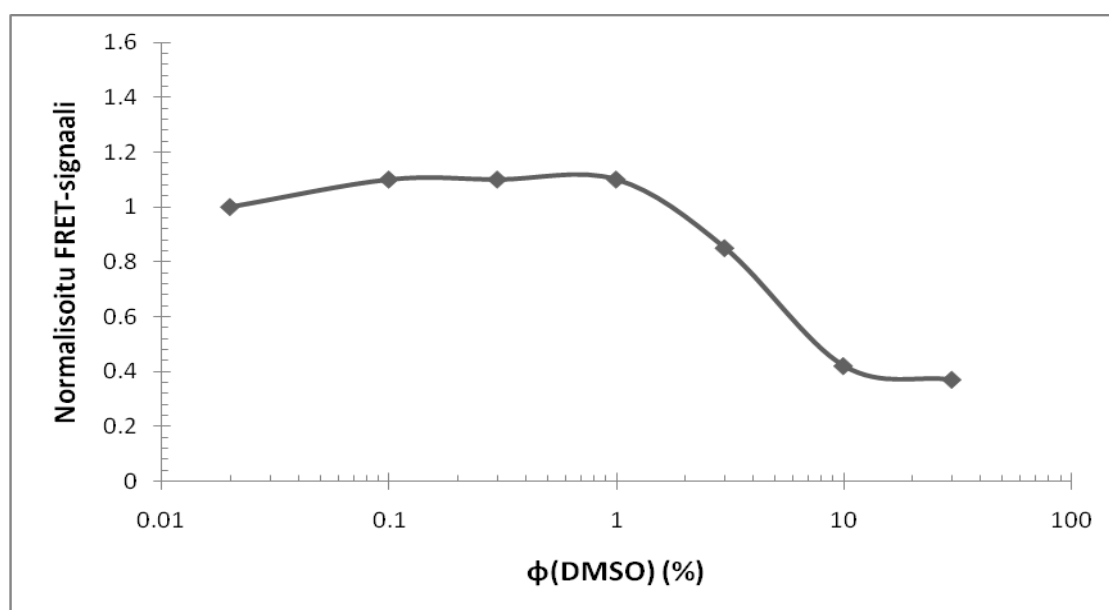
## 8.2 Olosuhteiden vaikutus leimatun gammaglobuliinin adsorptioon

Kokeen tarkoituksena oli tutkia etteivät käytetyt laimennusliuokset vaikuta leimatun  $\gamma$ G:n adsorptioon Eu(III)-partikkelien pinnalle. Veden vaikutusta leimatun  $\gamma$ G:n adsorptioon ei erikseen testattu, koska kaivoon pipetoidun veden tilavuudet olivat niin pieniä, että siitä aiheutuva laimennus ei vaikuta tuloksiin. Samankaltaisesta syystä suolahapon vaikutusta gammaglobuliinien adsorboitumiseen ei testattu.

Käytettäväksi adsorptiopuskuriksi valittiin 5 mM glysiinipuskuri (pH = 2,0) aikaisempien biofysiikan laboratoriossa tehtyjen kokeiden perusteella (Pihlasalo ym., 2010; Pihlasalo ym., 2011). Näiden mittausten perusteella valitussa glysiinipuskurissa leimattu proteiini adsorboitui parhaiten, jolloin nollanäytepitoisuudessa ja suuressa näytepitoisuudessa FRET-signaalien suhde oli maksimissaan. Käytetyn  $A\beta_{1-42}$ :n isoelektrinen piste on 5,31 (Expasy, 2011) ja  $\gamma$ G:n välillä 6,8–8,8 (Condie, 1981), joten matalassa pH:ssa molempien nettovaraus on positiivinen. Eu(III)-partikkelien pinta on negatiivisesti varautunut, joten matala pH on parempi peptidin/proteiinin adsorption kannalta.

### 8.2.1 Dimetyylisulfoksidi

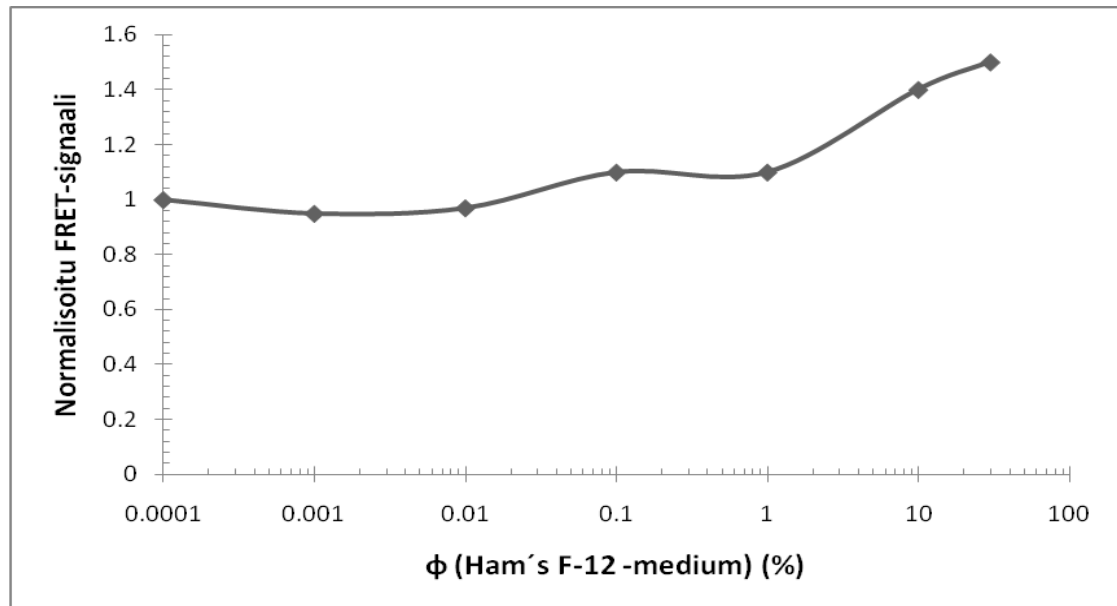
DMSO:n vaikutusta  $\gamma$ G:n adsorptioon tutkittiin käyttämällä eri DMSO-pitoisuuksia. Kuviosta 9 voidaan havaita, että alle 1 % DMSO-pitoisuuksilla signaalit pysyivät korkeina ja lähes muuttumattomina. Vasta 3 %:n DMSO:n tilavuusosuus kaivossa vaikutti leimatun  $\gamma$ G:n adsorptioon. Signaali laski tällöin 25 %. Suuremmilla DMSO-pitoisuuksilla normalisoitu signaali laski alle 0,5:een. Tuloksien perusteella voidaan todeta, että 1 %:n tai sitä pienemmät tilavuusosuudet eivät vaikuta leimatun  $\gamma$ G:n adsorptioon.



Kuvio 9. Normalisoitu FRET-signaali DMSO:n tilavuusosuuden funktiona.

### 8.2.2 Ham's F-12 -medium

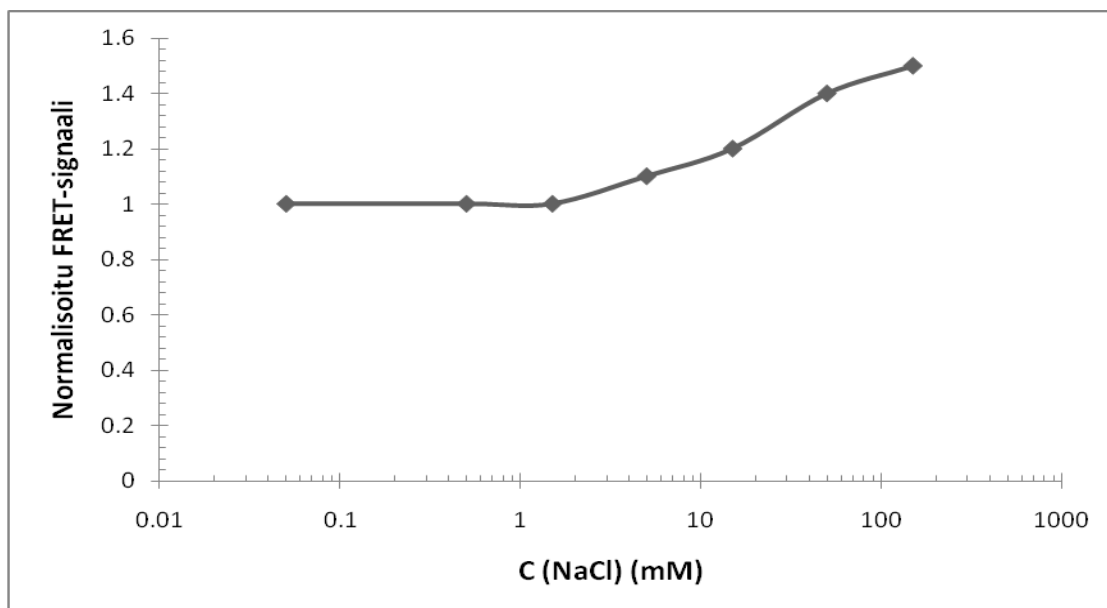
Ham's F-12 -mediumin vaikutusta gammaglobuliinien adsorptioon testattiin käyttämällä eri mediumipitoisuuksia. Kuviosta 10 nähdään, että 1 %:n mediumia kaivossa ei juurikaan vaikuta signaalin suuruuteen. Sen sijaan suuret F-12 -mediumipitoisuudet suurensivat signaalia. Tärkeintä oli huomata, että suuretkaan Ham's F-12 mediumipitoisuudet eivät vaikuta  $\gamma$ G:n adsorptioon eivätkä haittaa menetelmän toimivuutta.



Kuvio 10. Normalisoitu FRET-signaali Ham's F-12 -mediumin tilavuusosuuden funktiona.

### 8.2.3 Suolakonsentraatio

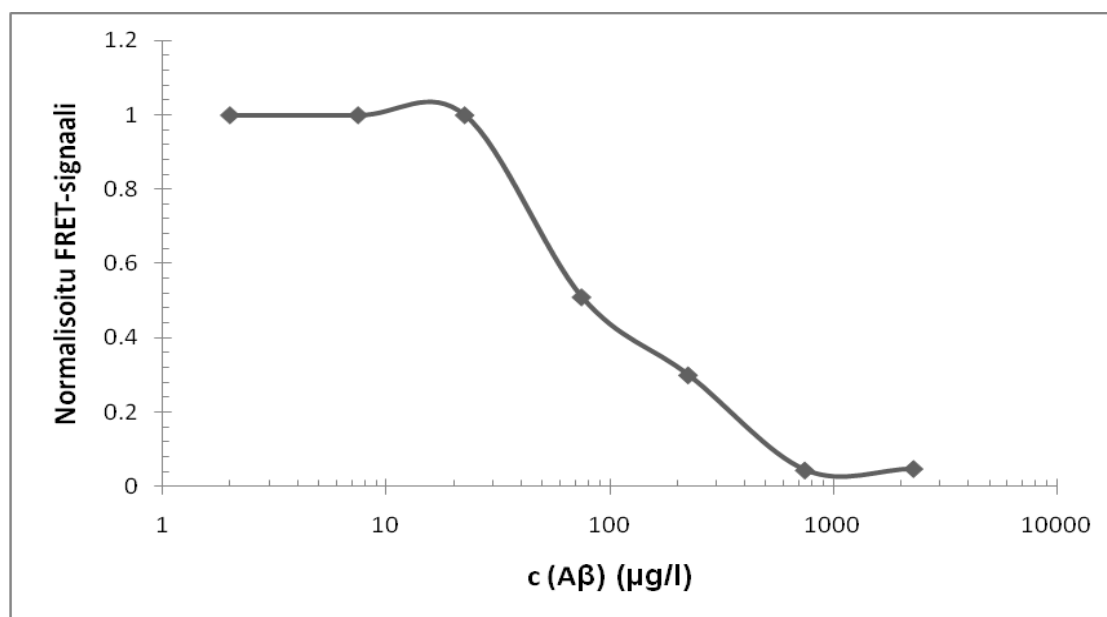
Suolapitoisuuden vaikutusta menetelmän herkkyyteen testattiin natriumkloridin avulla. Tulokset on havainnollistettu kuviossa 11. Pienillä suolapitoisuuksilla ei ollut vaikutusta signaalin suuruuteen. Vielä 15 mM suolapitoisuudella signaali ei noussut kovinkaan paljon nollanäytteen signaaliin verrattuna. Suuremmilla suolapitoisuuksilla signaali kasvoi jo huomattavasti enemmän. Tulosten perusteella voitaisiin olettaa, että suuri suolakonsentraatio parantaisi leimatun  $\gamma$ G:n adsorptiota.



Kuvio 11. Normalisoitu FRET-signaali NaCl:n konsentraation funktiona.

### 8.3 $\beta$ -amyloidipitoisuuden optimointi

Kokeessa määritettiin optimaalista A $\beta$ :n pitoisuutta mittauksissa. Mittaus oli herkin kalibraatiokäyrän jyrkimmällä osalla. Kuviossa 12 esitetyn kalibraatiokäyrän avulla arvioitiin menetelmän dynaamiseksi mittausalueeksi 25–700  $\mu\text{g/l}$  aggregoitumattomalle A $\beta$ :lle.



Kuvio 12.  $\beta$ -amyloidin kalibraatiokäyrä.

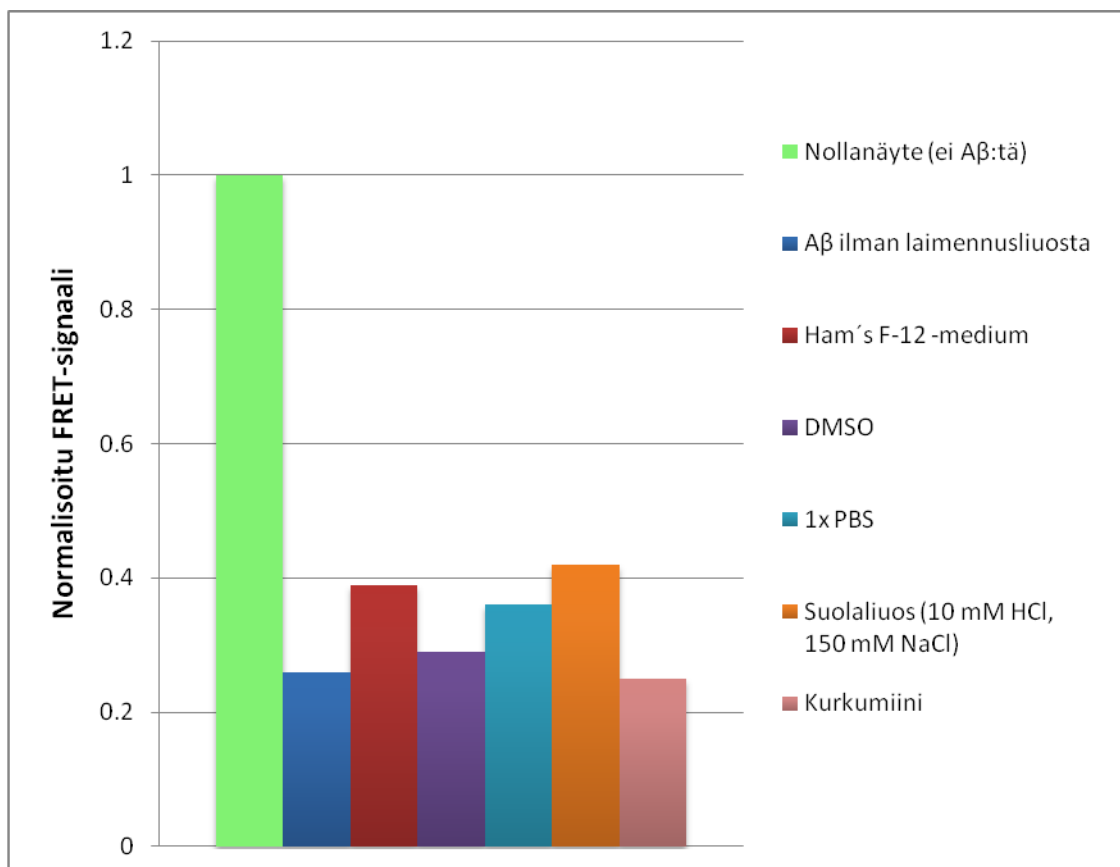
#### 8.4 Olosuhteiden vaikutus $\beta$ -amyloidien adsorptioon

Määrittelyksissä oli tarkoitus tutkia eri olosuhteiden vaikutusta  $A\beta$ :n adsorboitumiseen Eu(III)-partikkelien pinnalle. Testissä laimennusliuoksien määrät kaivoissa olivat samaa luokkaa tai hieman suurempia kuin olosuhdetesteissä, joissa eri liuksissa inkuboitua  $A\beta$ :a lisättiin kaivoihin. Tästä johtuen jokaisessa testissä, jossa tutkittiin laimennusliuoksen vaikutusta  $A\beta$ :n aggregoitumiseen, ei tarvinnut tehdä vertailunäytettä, jossa olisi tutkittu liuoksen vaikutusta  $A\beta$ :n adsorptioon.

Kuviosta 13 havaitaan, että nollanäytteeseen verrattuna signaalit ovat laskeneet alle puoleen. Tästä voidaan todeta, että  $A\beta$ :t ovat adsorboituneet Eu(III)-partikkelien pinnalle, mikä on estänyt leimatun proteiinin kiinnittymisen ja siksi signaali on matalampi.

Tuloksia verrattaessa  $A\beta$ -näytteeseen ilman laimennusliuosta huomataan, että signaalien suhde pysyy olosuhteesta riippuen melko samana. Tästä voidaan päätellä, ettei kaivoihin lisätyillä eri laimennusliuksilla ole merkittävää vaikutusta  $A\beta$  adsorboitumiseen Eu(III)-partikkelien pinnalle.





Kuvio 13. Olosuhteiden vaikutus signaaliin.

### 8.5 Olosuhteiden ja inkuboinnin vaikutus $\beta$ -amyloidien aggregoitumiseen

Kokeen tarkoituksena oli tutkia, miten valitut laimennusliuokset vaikuttavat A $\beta$ :n aggregoitumiseen ja miten se näkyy mitattavassa signaalissa. Tieteellisiin julkaisuihin (Stine ym., 2003; Wang ym., 2006) perustuen valittiin käytettäväksi laimennusliuoksiksi sellaisia liuoksia, joiden uskottiin muuttavan A $\beta$ :n käyttäytymistä ja jotka mahdollisesti estäisivät tai edesauttaisivat niiden aggregoitumista. Testeissä tutkittiin myös, oliko käytetyllä A $\beta$ -pitoisuudella inkubaatioissa vaikutusta aggregoitumiseen.

Inkuboimalla näytteitä 37 °C:ssa haluttiin tutkia, miten aika ja lämpötila vaikuttivat peptidin aggregoitumiseen eri laimennusliuoksissa. Tuloksia vertailtiin näytteisiin, joita ei inkuboitu 37 °C:ssa. Määrityksestä riippuen inkuboimattomista näytteistä mittaukset suoritettiin 30-50 minuutin jälkeen testien aloittamisesta ellei toisin mainita. Lisäksi testattiin kurkumiinin vaikutusta

estää aggregaattien muodostumista ja tutkittiin, miten vaikutusta pystyttiin havainnoimaan mitattavan signaalin perusteella.

Inkuboimattomien näytteiden kohdalla mittausteknisistä syistä johtuen signaalit vaihtelivat suuresti riippuen käytetystä laimennusliuoksesta. Taulukossa 4 on esimerkkinä käytetty inkubointipitoisuutta 150 mg/l. Joissakin olosuhteissa A $\beta$ :n aggregaatio tapahtui hyvin nopeasti. Mittausta ei pystytty suorittamaan tarpeeksi nopeasti (aikapisteessä 0 min) ja signaalit ehtivät nousta suuriksi. Seuraavissa kappaleissa on vertailtu lähinnä sitä, miten inkubointi vaikuttaa A $\beta$ :n aggregaatioon ja aggregaation havaitsemiseen kehitetyllä menetelmällä.

Taulukko 4. FRET-signaali inkuboimattomissa näytteissä.

Laimennusliuos	Pitoisuus kaivossa c(A $\beta$ ) ( $\mu$ g/l)	Normalisoitu FRET- signaali
DMSO	200	0,14
	390	0,048
Ham's F12 -medium	210	0,75
	410	0,64
1x PBS	210	0,82
	410	0,70
10 mM HCl, 150 mM NaCl	210	0,43
	390	0,19
10 mM HCl	300	0,37
vesi	200	0,27
	390	0,045

### 8.5.1 Laimennusliuoksena dimetyylisulfoksidi

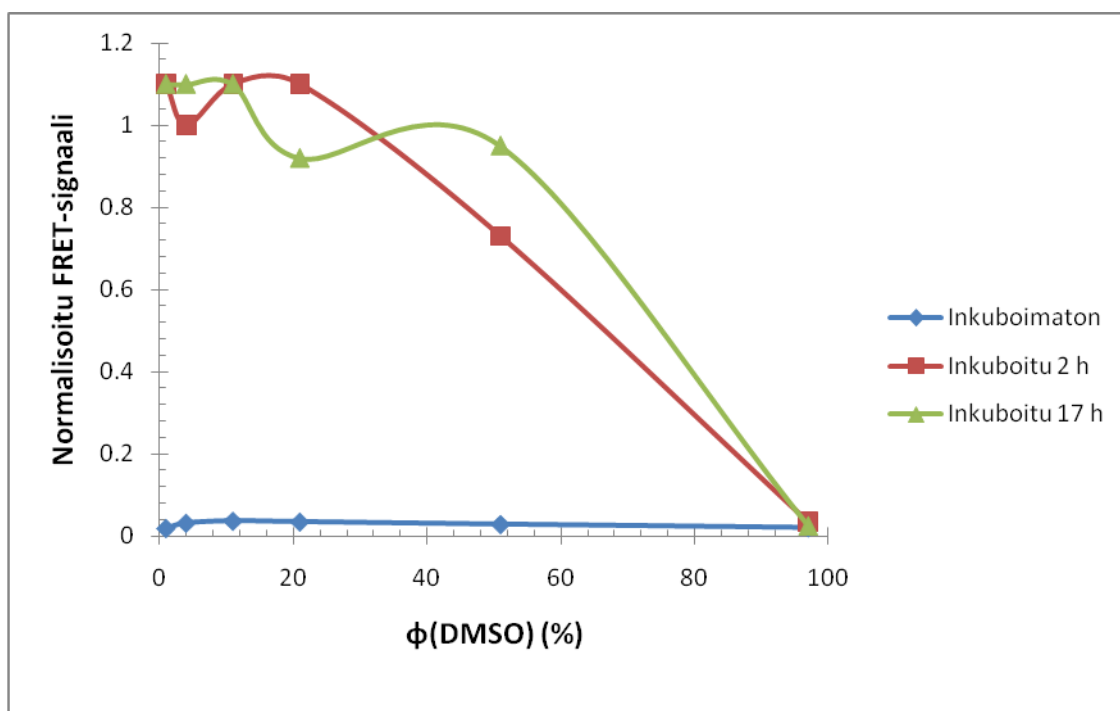
DMSO:n vaikutus A $\beta$ :n aggregoitumiseen testattiin käyttämällä eri A $\beta$ -pitoisuuksia ja DMSO:n tilavuusosuuksia. Lisäksi inkuboinnin vaikutusta amyloidien aggregoitumiseen testattiin inkuboimalla näytteitä eri aikoja. Kuvioista 14 ja 15 havaitaan, että inkubointiajalla ja A $\beta$ :n pitoisuudella on vaikutusta aggregoitumiseen. DMSO:n pitoisuuden vaikutus näytteissä nousi merkittäväksi tekijäksi vasta pitoisuuden ollessa erittäin suuri.

Inkuboimattomien näytteiden signaalit olivat lähes nolla molemmilla käytetyillä amyloidipitoisuuksilla riippumatta DMSO:n pitoisuudesta. Muista testeistä poiketen inkuboimattomat näytteet pystyttiin mittaamaan nopeasti heti testin aloittamisen jälkeen (10 min). Matalien signaalien oletettiin tarkoittavan sitä, että A $\beta$ :t olivat tässä vaiheessa yksittäisinä peptideinä eikä lyhyellä aikavälillä aggregaatteja juurikaan ehtinyt muodostua. Signaali oli tällöin pieni, koska A $\beta$ :t adsorboituivat tasaisesti Eu(III)-partikkelien pinnalle eikä leimattua proteiinia päässyt kiinnittymään, jolloin resonanssienergiansiirtoa ei tapahtunut.

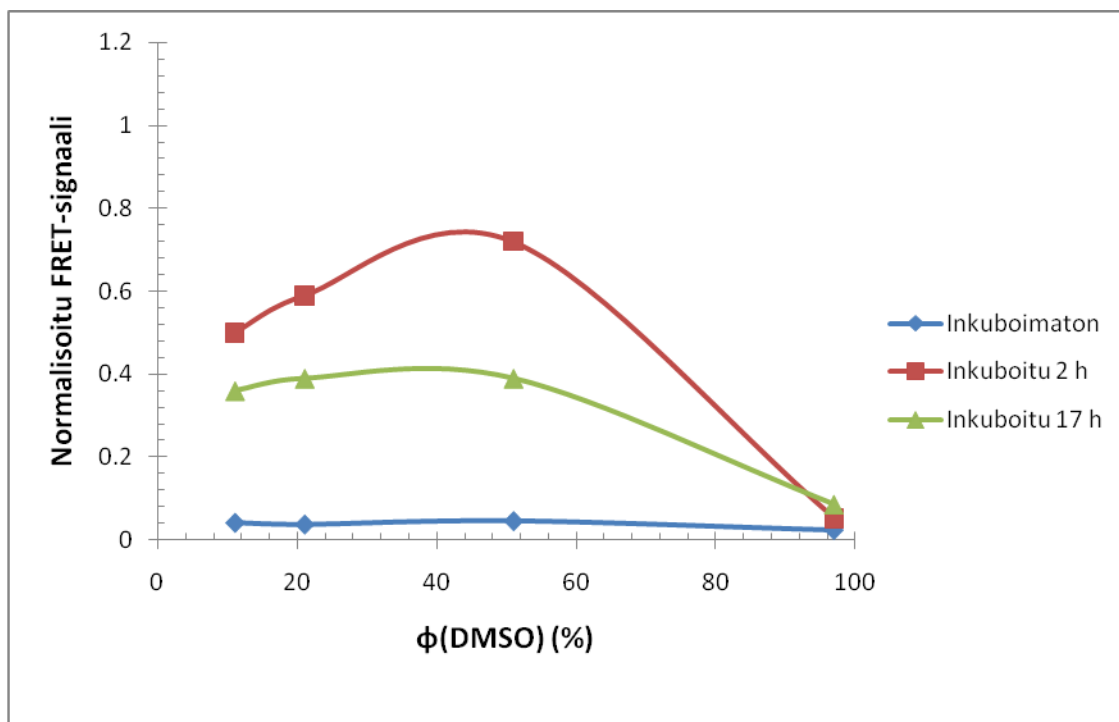
Kahden tunnin inkuboinnin jälkeen signaalit olivat huomattavasti nousseet kummallakin A $\beta$ :n pitoisuudella, lukuun ottamatta näytteitä, joissa DMSO-pitoisuus oli suurin. Aikaisemmassa kokeessa todettiin, että suurella DMSO-pitoisuudella on vaikutusta leimatun  $\gamma$ G:n adsorptioon. Tämä on yksi selitys sille, miksi signaalit pysyvät matalana korkeissa DMSO-pitoisuuksissa.

Signaalin ollessa suurempi A $\beta$ :n oletettiin muodostaneen aggregaatteja. Aggregaatit eivät täytä yhtä tiiviisti nanopartikkelien pintaa, jolloin leimattua proteiinia pääsee adsorboitumaan partikkelien pinnalle ja signaali on korkeampi. A $\beta$ -pitoisuudesta riippumatta voitiin havaita, että vain suurin DMSO-pitoisuus esti aggregaattien muodostumisen. Muilla DMSO-pitoisuuksilla A $\beta$ :t ovat kokonaan tai osittain aggregoituneet. 17 tunnin inkuboinnin jälkeen signaalit olivat hieman pudonneet suuremmassa (150 mg/l) A $\beta$ -pitoisuudessa. Näin ei kuitenkaan tapahtunut, kun A $\beta$ -pitoisuus oli pienempi (15 mg/l).

Teorian mukaan DMSO:lla on taipumus destabiloida  $\beta$ -levyrakenteita ja siten vähentää A $\beta$ :n aggregoitumista (Stine ym., 2003; Wang ym., 2006). Tästä johtuen oletettiin, että ainakin inkuboinnin alussa DMSO esti tai hidasti A $\beta$ :n aggregoitumista. Inkuboinnin jälkeen A $\beta$ :t kuitenkin aggregoituivat lukuun ottamatta näytteitä, joissa DMSO-pitoisuus oli suuri. Yhteenvetona voidaan kuitenkin todeta, että muihin laimennusliuoksiin verrattuna DMSO:ssa A $\beta$ :t aggregoituvat kuitenkin paljon hitaammin.



Kuvio 14. Inkuboinnin ja DMSO:n tilavuuden vaikutus signaaliin (A $\beta$ :n inkubaatiopitoisuus 15 mg/l).



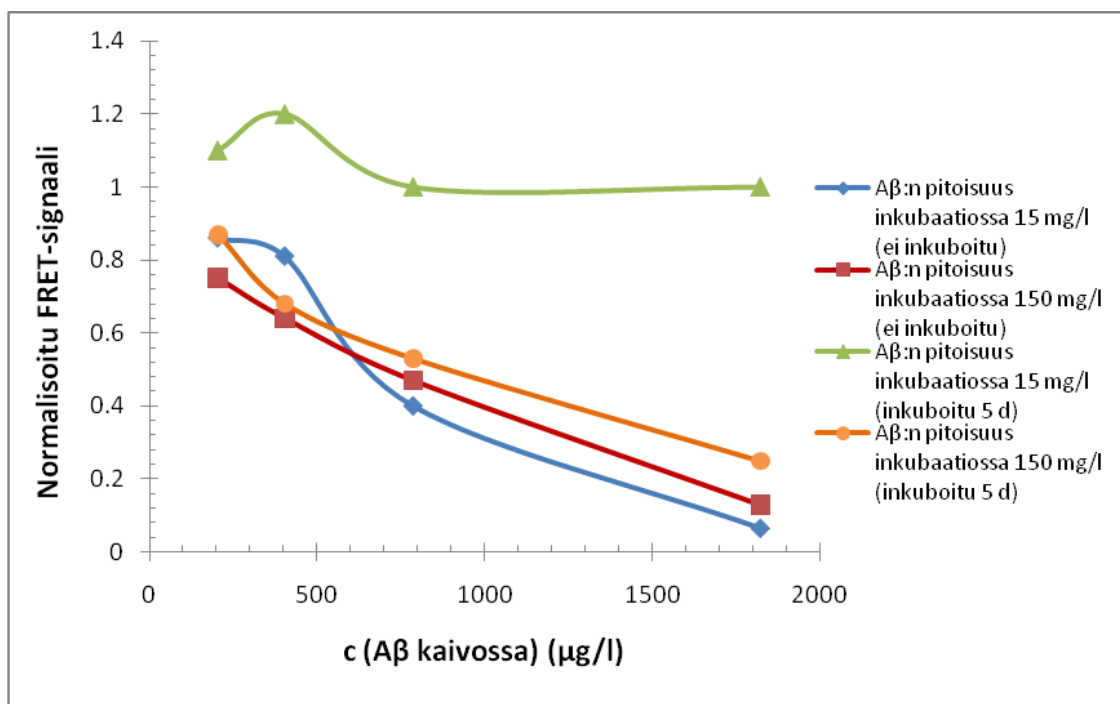
Kuvio 15. Inkuboinnin ja DMSO:n tilavuuden vaikutus signaaliin (A $\beta$ :n inkubaatiopitoisuus 150 mg/l).

### 8.5.2 Laimennusliuksena Ham's F-12 -medium

Ham's F-12 -mediumin vaikutusta A $\beta$ :n aggregoitumiseen testattiin käyttämällä eri A $\beta$ -pitoisuuksia sekä inkubointaessa että mittauksessa kaivoissa. Kuviosta 16 havaitaan, että käytettäessä pientä pitoisuutta kaivossa (200 ja 410  $\mu\text{g/l}$ ) signaalit ovat korkeat riippumatta inkubointiajasta tai A $\beta$ :n inkubointipitoisuudesta. Käytettäessä suuria A $\beta$ -pitoisuuksia kaivossa (790 ja 1800  $\mu\text{g/l}$ ) on pitoisuus voinut olla niin suuri, että vaikka aggregaatteja olisi muodostunut, ne ovat pystyneet peittämään partikkelien pinnan ja siten estämään leimatun proteiinin sitoutumisen. 5 vuorokauden inkuboinnin jälkeen kaikissa pitoisuuksissa signaalit ovat kohonneet eli lämpötilan ja ajan vaikutuksesta on muodostunut aggregaatteja.

Ham's F-12 -medium koostuu pääasiassa suoloista ja sillä on korkea ionivahvuus. Kirjallisuudessa korkean ionivahvuuden on todettu lisäävän proteiinien taipumusta muodostaa aggregaatteja (Andrade & Hlady, 1986), joten tällä on saattanut olla vaikutusta, miksi A $\beta$ :t ovat aggregoituneet liuoksessa

välittömästi. Korkean ionivahvuuden huomattiin aikaisemmissa kokeissa parantavan leimatun proteiinin adsorptiota, mikä sekin saattaa selittää osittain korkean signaalin. Verrattaessa F-12 -mediumin tulosta 1x PBS:n ja suolaliuoksen (10 mM HCl, 150 mM NaCl) tuloksiin voidaan todeta, että mediumissa aggregaatio ei ole yhtä voimakasta kuin näissä olosuhteissa.

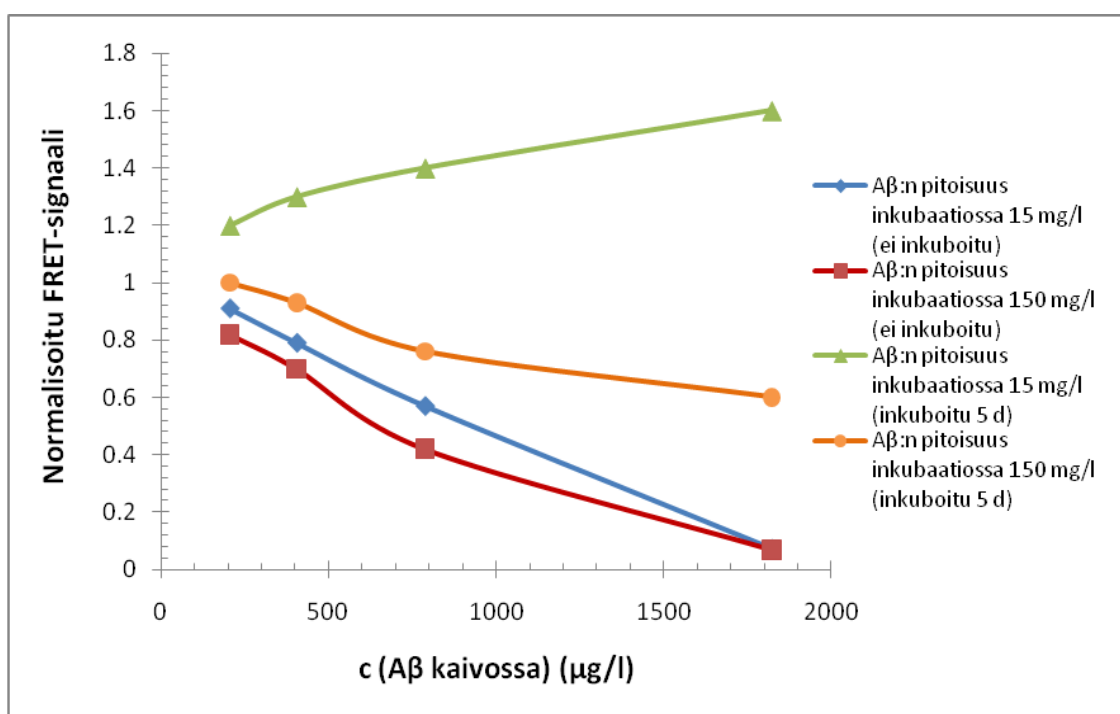


Kuvio 16. Inkuboinnin ja Aβ-pitoisuuden vaikutus FRET-signaaliin (laimennusliuoksena Ham's F-12 -medium).

### 8.5.3 Laimennusliuoksena fosfaattipuskuroitu suolaliuos

Fosfaattipuskuroidun suolaliuoksen (1x PBS) vaikutusta Aβ:n aggregoitumiseen testattiin käyttämällä eri Aβ-pitoisuuksia sekä inkuboitaessa että mittauksissa kaivoissa. Kuvion 17 perusteella havaitaan, Aβ:n pitoisuuden ollessa kaivossa pieni (200 ja 410 μg/l), signaalit ovat suuret jokaisessa näytteessä. Ainoastaan suurissa mittauspitoisuuksissa ( $\geq 790$  μg/l) signaalit ovat inkuboimattomissa näytteissä matalammat. Kuten Ham's F-12 -mediumin kohdalla myös tässä tapauksessa korkea ionivahvuus on saattanut vaikuttaa sekä Aβ:n aggregoitumiseen että menetelmän herkkyyteen sillä seurauksella, että mitattu signaali on korkea.

5 vuorokauden inkuboinnin jälkeen mitatuissa näytteissä signaalit kasvoivat jokaisen näytteen kohdalla. Signaalin kasvun ajan funktiona oletettiin merkitsevän A $\beta$ :n aggregoitumista, joten tulosten perusteella DMSO:hon ja Ham's F-12 -mediumiin verrattuna A $\beta$ :n aggregaatio 1x PBS:ssa näyttäisi olevan huomattavampaa. Kuten Ham's F-12 -mediumissakin, teorian mukaan A $\beta$ :n tulisi aggregoitua myös fosfaattipuskuroidussa suolaliuoksessa (Stine ym., 2003).



Kuvio 17. Inkuboinnin ja A $\beta$ -pitoisuuden vaikutus FRET-signaaliin (laimennusliuoksena 1x PBS).

#### 8.5.4 Laimennusliuoksena suolaliuos (10 mM HCl, 150 mM NaCl)

Suolaliuoksen (10 mM HCl, 150 mM NaCl) vaikutusta testattiin käyttämällä eri A $\beta$ -pitoisuuksia sekä inkuboitamatta että mittauksissa. Taulukossa 5 on esitetty mittaustulokset. Inkuboimattomissa näytteissä signaalit vaihtelevat melko paljon. Pienessä (7,3 mg/l) ja suuressa (150 mg/l) amyloidin inkubointipitoisuudessa signaalit ovat melko pienet, mutta inkubointipitoisuuden ollessa 15 mg/l signaali on suuri. Suolaliuoksessa A $\beta$ :t aggregoituvat hyvin nopeasti. Tässä tapauksessa inkuboimattomien näytteiden mittausta ei ole

pystytty suorittamaan tarpeeksi nopeasti, joten osassa näytteistä voimakas aggregaatio on tapahtunut jo ennen mittausta.

Inkuboitujen näytteiden signaalit kasvoivat ajan funktiona. Signaalit ovat korkeita, mikä viittaa voimakkaaseen aggregaatioon ajan funktiona. Inkubointipitoisuuden ollessa 150 mg/l signaali on matala eikä se noussut ajan funktiona. Tämä näyttäisi viittaavan siihen, että aggregaatio oli hyvin nopea eikä A $\beta$  aggregoitunut enää lisää pitkässä inkubaatiossa useiden vuorokausien aikana.

Taulukko 5. Suolaliuoksen (10 mM HCl, 150 mM ) vaikutus A $\beta$ :n aggregoitumiseen.

<b>Pitoisuus inkuboidessa c (A<math>\beta</math>) (mg/l)</b>	<b>Pitoisuus mittauksessa c (A<math>\beta</math>) (<math>\mu</math>g/l)</b>	<b>Normalisoitu FRET-signaali</b>	
		<b>Inkuboimaton</b>	<b>Inkuboitu 3 d</b>
7,3	300	0,50	1,3
15	300	1,0	1,2
	410	0,94	1,2
150	200	0,43	0,25

#### 8.5.5 Laimennusliuoksena suolahappo (10 mM)

Suolahapon vaikutusta testattiin käyttämällä eri A $\beta$ -pitoisuuksia inkuboidessa ja mittauksissa. Taulukossa 6 on esitetty testien tulokset. Tässäkin tapauksessa A $\beta$ :t selvästi aggregoituvat hyvin nopeasti, joten inkuboimattomien näytteiden mittausta ei ole pystytty suorittamaan tarpeeksi nopeasti ja osassa näytteistä voimakas aggregaatio on tapahtunut jo ennen mittausta.



Inkuboitujen näytteiden signaalit ovat nousseet riippumatta käytetystä A $\beta$ -pitoisuudesta eli aggregaatiota on tapahtunut. Voidaan myös todeta, että aggregaatio riippuu ajasta. Myös kirjallisuuden mukaan happamien olosuhteiden tulisi edistää amyloidifibrillien muodostumista (Lee ym., 2007).

Taulukko 6. Suolahapon (10 mM) vaikutus A $\beta$ :n aggregoitumiseen.

<b>Pitoisuus inkuboidessa c (A<math>\beta</math>) (mg/l)</b>	<b>Pitoisuus mittauksessa c (A<math>\beta</math>) (<math>\mu</math>g/l)</b>	<b>Normalisoitu FRET-signaali</b>	
		<b>Inkuboimaton</b>	<b>Inkuboitu 3 d</b>
7,3	300	0,14	0,89
15	300	0,78	1,03
	410	0,46	0,99
150	200	0,37	0,70

#### 8.5.6 Laimennusliuksena vesi

Veden vaikutusta testattiin käyttämällä eri A $\beta$ -pitoisuuksia inkuboidessa ja mittauksissa kaivoissa. Taulukossa 7 on esitetty testeihin liittyvät tulokset. Tuloksista havaitaan, että käytetystä A $\beta$ -pitoisuudesta riippumatta signaalit ovat inkuboimattomissa näytteissä melko pienet eli aggregaatteja ei muodostu vedessä nopeasti. Hidas aggregaattien muodostuminen vedessä on todettu myös kirjallisuudessa (Stine ym., 2003). Sama voitiin havaita, kun laimennusliuksena käytettiin DMSO:a.

Inkuboiduissa näytteissä inkubointipitoisuuden ollessa 7,3 ja 15 mg/l signaalit nousivat, joten A $\beta$ :n oletettiin joko aggregoituneen tai adsorboituvan koeputkien pinnoille ajan funktiona. Korkeassa A $\beta$ -pitoisuudessa 150 mg/l signaali ei noussut ajan funktiona, mikä viittaisi siihen, että vedessä A $\beta$  ei aggregoitunut huomattavasti edes usean vuorokauden aikana.

Taulukko 7. Veden vaikutus A $\beta$ :n aggregoitumiseen.

<b>Pitoisuus inkuboidessa c(A<math>\beta</math>) (mg/l)</b>	<b>Pitoisuus mittauksessa c(A<math>\beta</math>) (<math>\mu</math>g/l)</b>	<b>Normalisoitu FRET-signaali</b>	
		<b>Inkuboimaton</b>	<b>Inkuboitu 3 d</b>
7,3	300	0,029	0,82
15	300	0,35	1,1
	410	0,10	0,79
150	390	0,045	0,051

### 8.6 Kurkumiinin vaikutus

Testeissä A $\beta$ :t laimennettiin eri laimennusliuoksiin, jotka sisälsivät eri kurkumiinipitoisuuksia. Testeissä tutkittiin, miten lääkeaine vaikutti A $\beta$ :n aggregoitumiseen. Tulokset on esitetty taulukossa 8.

Verrattaessa kurkumiinia sisältäviä näytteitä ja samoihin olosuhteisiin valmistettuja näytteitä, joissa kurkumiinia ei käytetty havaitaan, että kurkumiinilla ei ole minkäänlaista vaikutusta FRET-signaaliin ja näin ollen A $\beta$ :n aggregaatioon. Tulokseen ei vaikuta käytetty kurkumiini- tai A $\beta$ -pitoisuus näytteessä. Aikaisempien tutkimusten perusteella (muun muassa Benassi ym., 2008, Zijian ym., 2010) kurkumiinin on todettu ehkäisevän A $\beta$ :n aggregoitumista. Mittauksissa signaalit nousevat ajan funktiona kurkumiinin läsnäollessa niissä olosuhteissa, joissa aikaisemmin jo todettiin signaalien kasvavan (esimerkiksi 1x PBS, suolaliuos ja suolahappo). Näissä olosuhteissa A $\beta$ :t siis aggregoituvat ajan funktiona eikä kurkumiini estä aggregoitumista.

Sytä kurkumiinin tehottomuuteen määrittelyksissä voi olla useampia. Todennäköisin syy oli se, että kehitettävä menetelmä mittasi kurkumiinin vaikutuksen toisella tavoin tai jopa väärin. Lisätty kurkumiinimäärä näytteisiin on saattanut olla liian pieni, jotta sillä olisi ollut vaikutusta. Kurkumiinista on

olemassa erilaisia muotoja ja erilaisia puhtausasteita, joten näillä on saattanut olla myös vaikutusta määrittelyn toimivuuteen.

Taulukko 8. Kurkumiinin vaikutus A $\beta$ :n aggregoitumiseen.

Olosuhde	Pitoisuus inkuboidessa c(A $\beta$ ) (mg/l)	Pitoisuus mittauksessa c(A $\beta$ ) ( $\mu$ g/l)	C(kurkumiini) ( $\mu$ M)	Normalisoitu FRET-signaali	
				Inkuboinaton	Inkuboitu 3 d
Vesi	7,3	300	0	0,029	0,82
			50	0,026	0,79
	15	300	0	0,35	1,1
			50	0,19	1,1
	150	200	0	0,27	0,12
			30	0,19	0,13
			300	0,075	0,080
DMSO	150	200	0	0,14	0,13
			30	0,10	0,14
			300	0,081	0,10
1x PBS	7,3	550	0	0,63	1,3
			50	0,53	1,2
	15	300	0	0,95	1,3
			50	0,76	1,2

(jatkuu)

Taulukko 8. Kurkumiinin vaikutus A $\beta$ :n aggregoitumiseen (jatkuu).

Olosuhde	Pitoisuus inkuboidessa c(A $\beta$ ) (mg/l)	Pitoisuus mittauksessa c(A $\beta$ ) ( $\mu$ g/l)	C(kurkumiini) ( $\mu$ M)	Normalisoitu FRET-signaali	
				Inkuboimaton	Inkuboitu 3 d
(10 mM HCl, 150 mM NaCl)	7,3	300	0	0,50	1,3
			50	0,44	1,3
	15	300	0	1,0	1,2
			50	0,84	1,3
	150	200	0	0,43	0,25
			30	0,45	0,22
			300	0,27	0,39
Suolahappo 10 mM	7,3	300	0	0,14	0,89
			50	0,32	1,1
	15	300	0	0,78	1,0
			50	0,76	1,2

### 8.7 Absorbanssimittaukset

Testeissä epäiltiin, että A $\beta$ :t saattoivat inkuboinnin aikana adsorboitua mikrosentrifugiputkien pinnoille. Asia haluttiin varmistaa suorittamalla muutamalle näytteelle adsorbanssimittaus. Tulokset on esitetty taulukossa 9. Absorbanssimittauksen avulla ei voitu detektoida amyloidien aggregaatiota, mutta signaalista voitiin päätellä analyytin läsnäolo näytteessä. Laskennallinen absorbanssi A $\beta_{1-42}$  oli 0,11, kun A $\beta$ :n pitoisuus oli 340 mg/l.

Koska inkuboimattomissa ja inkuboiduissa näytteissä absorbanssit ovat laskennallista absorbanssia suuremmat, voidaan päätellä, että A $\beta$ :t eivät adsorboitu mikrosentrifugiputkien pinnoille eivätkä hajoa laimennusliuosten vaikutuksesta. Inkuboiduissa näytteissä absorbanssit olivat vielä hieman kasvaneet ajan funktiona, mikä voi johtua näyteliuoksen haihtumisesta tai A $\beta$ :n

aggregaatiosta. Absorbanssin muutos on kuitenkin niin pieni, että aggregaatiota ei pystytä kvantitoimaan absorbanssimittauksin.

Taulukko 9. Absorbanssimittauksen tulokset (aallonpituudella 280 nm).

Näyte	Absorbanssi	
	Inkuboimaton	Inkuboitu 3 d
A $\beta$ + suolaliuos (10 mM HCl, 150 mM NaCl)	0,166	0,255
A $\beta$ + vesi	0,151	0,202
A $\beta$ + DMSO	ei mitattu	0,242

## 8.8 Western blot -analyysi

Western blot -analyysillä haluttiin vielä tutkia A $\beta$ :n aggregaatiota ja läsnäoloa mittauksessa. Kuvassa 1 on esitetty Western blot -analyysin tulokset. Western blot -analyysillä saatiin näkyviin veteen ja DMSO:iin liuotetut A $\beta$ :t sekä 30 minuuttia inkuboiduissa näytteissä että 3 vuorokautta inkuboiduissa näytteissä. Sen sijaan suolaliuoksessa (10 mM HCl, 150 mM NaCl) ja 1x PBS:ssä A $\beta$ :a ei löydetty.

Tulosten perusteella voidaan päätellä, että vedessä ja DMSO:ssa A $\beta$ :t eivät häviä määrittelyn aikana eivätkä aggregoidu yhtä voimakkaasti kuin muissa olosuhteissa. 1x PBS:ssä ja suolaliuoksessa (10 mM HCl, 150 mM NaCl) amyloidit ovat luultavasti aggregoituneet niin voimakkaasti, ettei niitä ole saatu siirrettyä geeliltä kalvolle.



Kuva 1. Western blot -analyysin tulokset.

1  $A\beta_{1-40}$  (150 mg/l) DMSO:ssa (inkuboitu 30 min)

2  $A\beta_{1-40}$  (150 mg/l) vedessä (inkuboitu 30 min)

3  $A\beta_{1-40}$  (150 mg/l) DMSO:ssa (inkuboitu 3 d)

4  $A\beta_{1-40}$  (150 mg/l) vedessä (inkuboitu 3 d)

5  $A\beta_{1-40}$  (15 mg/l) suolaliuoksessa (10 mM HCl, 150 mM NaCl) (inkuboitu 3 d)

6  $A\beta_{1-40}$  (150 mg/l) 1x PBS:ssa (inkuboitu 3 d)

## 9 YHTEENVETO

Opinnäytetyö suoritettiin osana tutkimusprojektia, jossa kehitettiin uutta nanopartikkeliperusteista määrittämenetelmää Alzheimerin taudin tutkimiseen. Työn tarkoituksena oli kehittää  $\beta$ -amyloidiaggregaattien havaitsemismenetelmä. Menetelmän toimivuutta testattiin eri laimennusliuoksilla käyttäen eri  $A\beta$ :n pitoisuuksia. Kirjallisuuden perusteella valittiin sellaisia laimennusliuoksia, joiden tiedettiin lisäävän tai estävän  $A\beta$ :n aggregaatiota. Tutkimuksissa pyrittiin optimoimaan mittausolosuhteita sekä tutkimaan, miten eri olosuhteet vaikuttivat  $A\beta$ :n aggregoitumiseen. Lisäksi menetelmän toimivuutta pyrittiin varmistamaan absorbanssimittausten ja Western blot –analyysin avulla.

Mittausolosuhteiden optimoinnissa määrittäksen dynaamiseksi mittausalueeksi arvioitiin 25–700  $\mu\text{g/l}$  aggregoitumattomalle  $A\beta$ :lle. Lisäksi tutkimuksissa saatiin selville, ettei käytetyillä laimennusliuoksilla ollut vaikutusta menetelmän toimivuuteen, eivätkä liuokset estäneet  $\gamma\text{G}$ :n ja  $A\beta$ :n adsorptiota Eu(III)-partikkelien pinnoille testeissä käytetyissä laimennusliuosten pitoisuuksissa.

Kehitetyllä menetelmällä saatujen FRET-signaalien perusteella pääteltiin, että mikään käytetyistä laimennusliuoksista ei estänyt  $A\beta$ :n aggregoitumista pitkässä inkubaatiossa. Lyhyemmässä ajassa vedessä ja DMSO:ssa ei muodostunut aggregaatteja, mutta inkuboinnin jälkeen näidenkin näytteiden kohdalla signaalit nousivat, josta voitiin päätellä  $A\beta$ :n aggregoituneen. Ham's F-12 -mediumissa, suolaliuoksessa (10 mM HCl, 150 mM NaCl), 1x PBS:ssä ja suolahapossa (10 mM)  $A\beta$ :t aggregoituivat jo inkubaation alussa. Näissä olosuhteissa aggregaatio jatkui hitaasti myös pidemmissäkin inkubaatioissa. Myös muissa tutkimuksissa on osoitettu  $A\beta$ :n aggregoituvan näissä olosuhteissa (Stine ym., 2003). Kurkumiinilla ei todettu olevan määrittäksessä vaikutusta  $A\beta$ -aggregaatteihin, jota olisi mittauksissa pystytty havaitsemaan. Tulosten mukaan se ei estänyt aggregaattien muodostumista inkuboitamattomissa eikä inkuboiduissa näytteissä.

Absorbanssimittauksen avulla saatiin osoitettua, että suurilla A $\beta$ -pitoisuuksilla A $\beta$ :t eivät hajoa laimennusliuosten vaikutuksesta määrittelyn aikana eivätkä adsorboitu inkuboitessa mikrosentrifugiputkien pinnoille. Western blot -analyysissä ainoastaan veteen ja DMSO:hon liuotetut näytteet saatiin kalvolle esiin. Tämä viittasi siihen, että A $\beta$ :n aggregoituminen vedessä ja DMSO:ssa ei mahdollisesti ole yhtä voimakasta kuin muissa laimennusliuoksissa, mikä oli myös kehitetyllä menetelmällä saatu tulos. Kirjallisuudessa on osoitettu DMSO:n estävän ja hidastavan A $\beta$ -aggregaattien muodostumista (Stine ym., 2003). Vedellä ei estävää vaikutusta ole haivattu, mutta sen sijaan sen on todettu hidastavan A $\beta$ :n aggregoitumista (Stine ym., 2003).

Koska määrittelyn kehitys on alkuvaiheessa, täyttää varmuutta sen toimivuudesta ei voida vielä sanoa. Jos määrittelyn toimivuus saadaan varmasti osoitettua tunnetulla rinnakkaismenetelmällä, se on lupaava vaihtoehto korvaamaan nykyisin käytössä olevia menetelmiä.



## LÄHTEET

Amorfix life sciences Ltd (2011) Amorfix aggregated A $\beta$  assay (A<sup>4</sup>) service. Viitattu 22.3.2011 [http://www.amorfix.com/pdf\\_specs/a4/amorfix\\_a4\\_presentation.pdf](http://www.amorfix.com/pdf_specs/a4/amorfix_a4_presentation.pdf).

Andrade, J. D.; Hlady, V. (1986) Protein adsorption and materials biocompatibility: A tutorial review and suggested hypotheses. *Advanced in Polymer Science*, **79**: 1–63.

Ball, V.; Schaaf, P.; Voegel, J.-C. (2003) Mechanism of interfacial exchange phenomena for proteins adsorbed at solid-liquid interfaces, chapter 11, in: Malmsten, M. (Ed.), *Biopolymers at Interfaces*, Surfactant Science Series, volume 110, second edition ss. 295–320. New York, NY: Marcel Dekker, Inc.

Benassi, R.; Ferrari, E.; Lazzari, S.; Spagnolo, F.; Saladini, M. (2008) Theoretical study on Curcumin: A comparison of calculated spectroscopic properties with NMR, UV–vis and IR experimental data. *Journal of Molecular Structure*, **892**: 168–176.

Chiang, P. K.; Lam, M. A.; Lu, Y. (2008) The many faces of amyloid  $\beta$  in Alzheimer's disease. *Current Molecular Medicine*, **8**: 580–584.

Cisbio Bioassays (2009) TR-FRET basics. Viitattu 28.1.2011 [http://www.htrf.com/technology/htrftheory/tr\\_basics/#principles](http://www.htrf.com/technology/htrftheory/tr_basics/#principles).

Clegg, R. M. (1995) Fluorescence resonance energy transfer. *Current Opinion in Biotechnology*, **6**: 103–110.

Condie, R. M. (1981) Pure intravenous human and animal gamma globulins. US patent number US4296027.

Duodecim Terveyskirjasto (2011) Gammaglobuliini. Viitattu 12.2.2011 [http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p\\_artikkeli=ltt00932](http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=ltt00932).

Expasy (2011) Proteomics tools: ProtParam. Viitattu 31.3.2011 <http://au.expasy.org/>

Frida, P.; Anisimova, S. V.; Popovich, N. (2007) Congo red and protein aggregation in neurodegenerative diseases. *Brainresearchreviews*, **53**: 135–160.

Goldsbury, C.; Baxa, U.; Simon, M. N.; Steven, A. C.; Engel, A.; Wall, J. S.; Aebi, U.; Muller, S. A. (2011) Amyloid structure and assembly: Insights from scanning transmission electron microscopy. *Journal of Structural Biology*, **173**: 1–13.

Gudging Dickson, E.F.; Pollak, A. & Diamandis, E.P. (1995) Ultrasensitive bioanalytical assays using time-resolved fluorescence detection. *Pharmacology & Therapeutics*, **66**: 207–235.

Heino, J.; Vuento, M. (2007) Biokemian ja solubiologian perusteet. 1. painos. ss. 51–63. Helsinki: WSOY Oppimateriaalit Oy.

Höök, F. (1997) Development of a novel QCM technique for protein adsorption studies, PhD Thesis, Chalmers University of Technology and Göteborg University, Göteborg, Ruotsi.

Invitrogen Molecular Probes (2009) Alexa Fluor succinimidyl esters manual. Viitattu 12.2.2011 <http://probes.invitrogen.com/media/pis/mp10168.pdf>.

Jaarinen, S. & Niiranen, J. (2008) Laboratorion analyysitekniikka. 5.–6. painos. ss. 66–68. Helsinki: Edita Prima Oy.

Khurana, R.; Coleman, C.; Ionescu-Zanetti, C.; Carter, S. A.; Krishna, V.; Grover, R.K.; Roy, R.; Singh, S. (2005) Mechanism of thioflavin T binding to amyloid fibrils. *Journal of Structural Biology*, **151**: 229–238.

- Lakowicz, J. R. (2006) Principles of fluorescence spectroscopy. Third edition ss. 1-8. LLC: New York, NY: Springer Science+Business Media.
- Lee, C-C.; Nayak, A.; Sethuraman, A.; Belfort, G.; McRae, G. J. (2007) A Three-stage kinetic model of amyloid fibrillation. *Biophysical Journal*, **92**: 3448–3458.
- McKee, T. & McKee, J. R. (2003) *Biochemistry: The molecular basis of life*. Third edition ss. 11, 124–143. New York, NY: McGraw-Hill.
- Nakanishi, K.; Sakiyama, T.; Imamura, K. (2001) On the adsorption of proteins on solid surfaces, a common but very complicated phenomenon. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **9**: 233–244.
- Nilsson, M. R. (2004) Techniques to study amyloid fibril formation *in vitro*. *Methods*, **34**: 151–160.
- Olympus Microscopy resource center (2010). Basic concepts in fluorescence. Viitattu 27.1.2011 <http://www.olympusmicro.com/primer/techniques/fluorescence/fluorescenceintro.html>.
- Ono, K.; Hasegawa, K.; Naiki, H.; Yamada, M. (2004). Curcumin has potent anti-amyloidogenic effects for Alzheimer's  $\beta$ -amyloid fibrils *in vitro*. *Journal of Neuroscience Research* **75**:742–750.
- Pihlasalo, S.; Pellonperä, L.; Martikkala, E.; Hänninen, P.; Härmä, H. (2010) Sensitive fluorometric nanoparticle assays for cell counting and viability. *Analytical Chemistry*, **82**: 9282–9288.
- Pihlasalo, S.; Kirjavainen, J.; Hänninen, P.; Härmä, H. (2011) High sensitivity luminescence nanoparticle assay for the detection of protein aggregation. *Analytical Chemistry*, **83**: 1163–1166.
- Quiquampoix, H.; Ratcliffe, R. G. (1992) A  $^{31}\text{P}$  NMR study of the adsorption of bovine serum albumin on montmorillonite using phosphate and the paramagnetic cation  $\text{Mn}^{2+}$ : modification of conformation with pH. *Journal of Colloid and Interface Science*, **148**: 343–352.
- Quiquampoix, H. (2000) Mechanisms of protein adsorption on surfaces and consequences for extracellular enzyme activity in soil. *Soil Biochemistry*, **10**: 171–206.
- Rabe, M.; Verdes, D.; Seeger, S. (2011) Understanding protein adsorption phenomena at solid surfaces. *Painossa*.
- Sabate, R.; Saupe, S. J. (2007) Thioflavin T fluorescence anisotropy: An alternative technique for the study of amyloid aggregation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **360**:135–138.
- Solunetti (2006) Lämpöelektronimikroskopia (TEM). Viitattu 20.3.2011 <http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/tem/2/>.
- Stine, B.W.; Dahlgren, K.D.; Krafft, G.A.; LaDu, M.J. (2003) *In vitro* characterization of conditions for amyloid- $\beta$  peptide oligomerization and fibrillogenesis. *The Journal of Biological Chemistry*, **278**: 11612–11622.
- Strasburg, G.M. & Ludescher, R.D. (1995) Theory and applications of fluorescence spectroscopy in food research. *Trends in Food Science & Technology*, **6**: 69–75.
- Thermo Scientific. NanoDrop 1000 spectrofotometer V3.7 user's manual (2008). Viitattu 20.2.2011 <http://www.nanodrop.com/Library/nd-1000-v3.7-users-manual-8.5x11.pdf>.
- Wang, S. S-S.; Chen, Y-T.; Chen, P-H.; Liu, K-N. (2006) A kinetic study on the aggregation behavior of  $\beta$ -amyloid peptides in different initial solvent environments. *Biochemical Engineering Journal*, **29**: 129–138.

Zijian, X.; Liming, L.; Zhonghua, L.; Fengtao, J.; Weiyan, S.; Minjuan, W.; Ling, L.; Shengliang, L.; Feng, L.; Xianzhang, B. (2010) Potential therapeutic effects of curcumin: Relationship to microtubule-associated proteins 2 in A $\beta$ 1–42 insult. *Brainresearcher*, **1361**: 115–123.